

Reinigung und teilweise Charakterisierung
des Hauptproteins der Peroxisomenmembran
aus Laubblättern von Lens culinaris

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn
—

von

BERND LUDWIG
—
aus Alsfeld

Marburg/Lahn 1976
—

Druck: Mauersberger, Marburg

Reinigung und teilweise Charakterisierung
des Hauptproteins der Peroxisomenmembran
aus Laubblättern von Lens culinaris

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

BERND LUDWIG

aus Alsfeld

Marburg/Lahn 1976

Druck: Mauersberger, Marburg



Vom Fachbereich Chemie der Philipps Universität
Marburg/L. als

Dissertation angenommen am 08.06.76

Tag der mündlichen Prüfung 23.06.76

Berichterstatter Prof. Dr. H. Kindl

Mitberichterstatter Prof. Dr. H. Follmann

<u>Gliederung</u>	Seite
Zusammenfassung	3
Liste der Abkürzungen	4
<u>I. Einleitung</u>	5
1. Pflanzliche Mikrokörper: Definition, Charakteristika, Funktionen	5
a) Glyoxysomen	5
b) Peroxisomen	6
2. Mikrokörper - Biogenese	7
a) Peroxisomen	7
b) Übergang Glyoxysomen - Peroxisomen	8
3. Mikrokörper - Membranen	9
<u>II. Methoden</u>	11
1. Pflanzenmaterial	11
2. Organellen- und Membrantrennungen durch Dichtegradientenzentrifugation	11
a) Thylakoide, Mitochondrien, Peroxisomen	11
b) Peroxisomen - Membran	13
c) Mikrosomen - Endoplasmatisches Retikulum	13
3. Proteintrennungen	14
a) Säulentrennungen	14
b) Elektrophoretische Trennungen	15
α) SDS- PAGE	16
β) Harnstoff- und Triton - PAGE	20
γ) Isoelektrische Fokussierung in PAG unter denaturierenden Bedingungen	20
c) Geschwindigkeitszentrifugation im Dichte- gradienten unter denat. Bedingungen	22
d) Ankonzentrieren SDS - haltiger Protein- lösungen	22
4. Proteinmarkierungen	23
a) Fluoreszenz	23
b) Radioaktivität	24

5. Weitere Proteincharakterisierungen	25
a) Löslichkeitsverhalten	25
b) Aminosäuren - Zusammensetzung	26
c) Glykoprotein - Test	27
6. Quantitative Bestimmungen	27
a) Enzyme	27
b) Protein	28
c) Chlorophyll	28
d) Saccharose	28
e) Radioaktivität	29
III. <u>Ergebnisse</u>	30
1. Auftrennung von Zellorganellen und Membranen in Dichtegradienten und der Vergleich der Proteinmuster der Membranen	30
2. Löslichkeitsverhalten der peroxisomalen Membranproteine	46
3. Reinigung und weitere Charakterisierung des Hauptproteins (SP-63) der perox. Membran	49
IV. <u>Diskussion</u>	61
1. Proteinzusammensetzung der Peroxisomenmembran	
2. Intrazelluläre Verteilung des SP-63	70
3. Relevanz	73
V. <u>Literaturverzeichnis</u>	75

Zusammenfassung

1. Die Peroxisomenmembran der Laubblätter von Lens culinaris wurde gereinigt und mit Hilfe der SDS - Gelelektrophorese auf ihr Proteinmuster hin untersucht.
2. Es wurde gezeigt, daß die Hauptkomponente ein Protein vom Molekulargewicht 63 000 (SP-63) ist.
3. Dieses Protein wurde gereinigt und teilweise charakterisiert.
4. In anderen Organellenmembranen oder Membransystemen der Zellen von Linsen - Laubblättern ließ sich kein Protein gleichen Molekulargewichts mit ähnlichen Eigenschaften nachweisen.

5. Weitere Proteincharakterisierungen	25
a) Löslichkeitsverhalten	25
b) Aminosäuren - Zusammensetzung	26
c) Glykoprotein - Test	27
6. Quantitative Bestimmungen	27
a) Enzyme	27
b) Protein	28
c) Chlorophyll	28
d) Saccharose	28
e) Radioaktivität	29
III. <u>Ergebnisse</u>	30
1. Auftrennung von Zellorganellen und Membranen in Dichtegradienten und der Vergleich der Proteinmuster der Membranen	30
2. Löslichkeitsverhalten der peroxisomalen Membranproteine	46
3. Reinigung und weitere Charakterisierung des Hauptproteins (SP-63) der perox. Membran	49
IV. <u>Diskussion</u>	61
1. Proteinzusammensetzung der Peroxisomenmembran	
2. Intrazelluläre Verteilung des SP-63	70
3. Relevanz	73
V. <u>Literaturverzeichnis</u>	75

Zusammenfassung

1. Die Peroxisomenmembran der Laubblätter von Lens culinaris wurde gereinigt und mit Hilfe der SDS - Gelelektrophorese auf ihr Proteinmuster hin untersucht.
2. Es wurde gezeigt, daß die Hauptkomponente ein Protein vom Molekulargewicht 63 000 (SP-63) ist.
3. Dieses Protein wurde gereinigt und teilweise charakterisiert.
4. In anderen Organellenmembranen oder Membransystemen der Zellen von Linsen - Laubblättern ließ sich kein Protein gleichen Molekulargewichts mit ähnlichen Eigenschaften nachweisen.

Liste der Abkürzungen

EDTA	Äthylendiamintetraacetat, Na-Salz
EM	Extraktionsmedium, zur Lösung von Proteinen in SDS; siehe S. 16
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GM	Grinding medium, zur Homogenisation des Pflanzenmaterials, siehe S. 11
MW	Molekulargewicht
NADH	β -Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
PAG(E)	Polyacrylamid-Gel (-Elektrophorese)
rpm	Umdrehungen / Minute
SDS	Na-dodecylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Enzymeinheit
w/v, w/w	Mischungsverhältnisse Gewicht/Volumen, Gewicht/Gewicht

I. Einleitung

1. Pflanzliche Mikrokörper:

Definition, Charakteristika, Funktionen

Mikrokörper sind in fast allen eukaryontischen Pflanzen durch elektronenmikroskopische Untersuchungen nachgewiesen worden ^{1,2,3)}; der Begriff bezeichnet eine morphologisch einheitliche Spezies von Zellorganellen, die mit einem Durchmesser von 0.5 bis 1.5 μ m kleiner sind als die Plastiden und oft auch als Mitochondrien. Tierische wie pflanzliche Mikrokörper sind von einer einfachen Membran umgeben sowie durch ihre mechanische und osmotische Fragilität und durch Katalase als Leitenzym gekennzeichnet. Während allerdings tierische Mikrokörper (Peroxisomen) ⁴⁾ verschiedener Herkunft eine weitgehend ähnliche Enzymausstattung besitzen, ist die Ausstattung von Mikrokörpern aus verschiedenen pflanzlichen Zellen sehr heterogen. Aufgrund ihrer biochemischen Charakterisierung werden in Pflanzen zwei spezialisierte Erscheinungsformen dieser Organellen unterschieden, deren enzymatische Fähigkeiten einen Hinweis auf völlig unterschiedliche Funktionen im Stoffwechsel der Zelle geben.

a) Glyoxysomen

Mikrokörper in fettreichen Speichergeweben, im Endosperm oder in Keimblättern bei hypogäischer Keimung werden als Glyoxysomen bezeichnet ⁵⁾. Sie sind darauf spezialisiert, das Reservelipid des keimenden Samens abzubauen und das entstehende Acetyl - Coenzym A über den Glyoxylat - Zyklus in Succinat zu überführen, das dann außerhalb der Glyoxysomen über Oxalacetat in die Gluconeogenese eingeschleust werden kann. Einen ersten Hinweis auf die Rolle der Glyoxysomen im Lipidabbau geben elektronenmikroskopische Befunde über die enge räumliche Assoziation

zwischen diesen Organellen und den Lipidtropfen ⁶⁾; in-
zwischen sind die einzelnen Schritte der Abbauege bioche-
misch eingehend untersucht, so etwa Aktivierung und Abbau
der Fettsäuren ^{7,8,9)} und Enzyme des Glyoxylat - Zyklus
^{10,11)}. Neben einer Reihe von weiteren Enzymen und neben
Katalase gelten vor allem Isocitratlyase sowie die Acetyl-
Coenzym A - umsetzenden Enzyme Malatsynthase und Citrat-
synthase als Leitenzyme für Glyoxysomen.

b) Peroxisomen

Peroxisomen, zur Unterscheidung von tierischen Peroxiso-
men auch als Blattperoxisomen bezeichnet, besitzen in
photosynthetisierenden Blättern die Enzymausstattung für
Teile des Glykolat - Zyklus ¹²⁾, der mit dem Prozeß der
Photorespiration verknüpft ist. Unter bestimmten Sätti-
gungsbedingungen der Photosynthese werden erhebliche pro-
zentuale Anteile des fixierten Kohlenstoffs zu Phospho-
glykolat umgesetzt unter Beteiligung der Ribulosediphos-
phat - oxygenase ¹³⁾; es gelangt als Glykolat in die Per-
oxisomen, wo die beiden Folgeschritte, Oxidation und
Transaminierung zu Glycin, katalysiert werden. Der "Über-
gang von Glycin nach Serin findet außerhalb der Peroxiso-
men in den Mitochondrien statt ¹⁴⁾. Durch Transaminierung
und Reduktion wird Serin schließlich in den Peroxisomen
als Glycerat wieder für den anabolen Kohlenhydratstoff-
wechsel bereitgestellt. Die Funktion des Glykolat - Zyk-
lus könnte damit in der partiellen Rückführung des durch
Photorespiration für die Kohlenhydratsynthese verlorenen
Kohlenstoffs liegen ¹⁵⁾.

Das funktionelle Zusammenspiel zwischen Mikrokörper und
Chloroplast wird durch elektronenmikroskopische Unter-
suchungen bestätigt, die eine räumliche Assoziation
zwischen beiden Organellen nachweisen ⁶⁾; auch die un-
gleiche Verteilung von Peroxisomen zwischen Mesophyll -

und Gefäßbündelscheiden - Zellen bei Pflanzen mit C_4 - Photosynthesestoffwechsel (Hatch/Slack) steht im Einklang mit diesem Konzept ¹⁶⁾.

Neben Katalase gelten Glykolatoxidase und Hydroxypyruvat-reduktase als Leitenzyme für Blattperoxisomen ¹⁷⁾.

2. Mikrokörper - Biogenese

Da Mikrokörper kein genetisches Material und keinen Proteinbiosyntheseapparat besitzen, muß eine Teilautonomie, wie für Mitochondrien und Chloroplasten festgestellt, bei Mikrokörpern ausgeschlossen werden; somit müssen alle Komponenten, aus denen sich Matrix und Membran zusammensetzen, an anderer Stelle in der Zelle synthetisiert werden.

a) Peroxisomen

Abgesehen von Peroxisomen in Keimblättern, die photosynthetisch aktiv sind, läßt sich die Entwicklung von Peroxisomen oder ihren Proformen in undifferenzierten oder noch nicht vollständig differenzierten Zellen verfolgen, wie sie Zellkulturen ¹⁸⁾ und etiolierte Laubblätter ^{19,20)} darstellen. Elektronenmikroskopische Aufnahmen legen eine Herkunft der Peroxisomen aus dem endoplasmatischen Retikulum nahe ^{21,22)}, was durch ähnliche Phospholipid - Zusammensetzung und Anwesenheit einer Actinomycin A - insensitiven NADH - Cytochrom c - Reduktase an beiden Membranen gestützt wird ²²⁾.

Die abgeschnürten Vesikel entwickeln sich weiter, wobei sich ihre Schwebedichten in Saccharosegradienten erhöhen ^{23,24)}. Bei Belichtung und einsetzender Photosynthese

werden die Aktivitäten der peroxisomalen Enzyme stark erhöht, die Peroxisomen zeigen eine erhöhte Gleichgewichtsdichte auf Dichtegradienten und sind nach elektronenoptischen Befunden in der Zelle mit den Chloroplasten assoziiert ²¹⁾. Es handelt sich dabei um einen spezifischen Lichteffect, da nur bestimmte Enzyme induziert werden und der Vorgang nicht mit der Entwicklung des Photosyntheseapparates gekoppelt sein muß, wie Versuche mit kurzen Belichtungszeiten und mit Hemmstoffen gezeigt haben ¹⁹⁾.

b) Hypothesen zu einem möglichen "Übergang Glyoxysomen - Peroxisomen

Werden Keimblätter bestimmter fettreicher Samen während ihrer normalen Entwicklung photosynthetisch aktiv, so findet, ausgelöst durch die Belichtung, eine drastische "Änderung der Enzymausstattung der Mikrokörper statt. Glyoxysomale Aktivitäten sinken rapide ab, gleichzeitig steigen peroxisomale stark an ^{1,2)}.

Für diesen erneuten Differenzierungsschritt sind 3 Hypothesen formuliert worden ¹⁷⁾:

- Glyoxysomen und Peroxisomen sind separate Organellen; Glyoxysomen werden durch Einfluß der Belichtung abgebaut und durch neusynthetisierte Peroxisomen ersetzt.
- Glyoxysomen und Peroxisomen sind separate Organellen, die zu verschiedenen Zeiten stoffwechselaktiv sind.
- Glyoxysomen und Peroxisomen sind identische Organellen; unter Einfluß des Lichts werden lediglich in den Mikrokörpern glyoxysomale Aktivitäten abgeschaltet und peroxisomale Enzyme in die Organellenaufgenommen.

Mit dem Nachweis, daß nach einem Maximum glyoxysomaler Aktivität bei weiterem etiolierten Wachstum die Menge

glyoxysomalen Proteins abnimmt, die spezifische Aktivität glyoxysomaler Enzyme aber gleichbleibend ist, und mit dem Befund, daß unabhängig von der Anzahl verbliebener Glyoxysomen die Aktivierung peroxisomaler Enzyme durch Licht stets gleich groß ist, glaubt Beevers^{25,26,27)}, Argumente für einen Abbau von Glyoxysomen und eine davon unabhängige Neusynthese von Peroxisomen gefunden zu haben, zumal nach Belichten das isolierbare peroxisomale Protein nur noch ein Viertel des glyoxysomalen Proteins ausmacht.

Diese Hypothese wird in Zweifel gezogen durch Untersuchungen, bei denen auf das "Überlappen von Glyoxysomen mit Proteinkörpern und Etioplasten im Saccharosegradienten hingewiesen wird, die im späteren Stadium abgebaut werden oder ihre Lage im Gradienten ändern und so eine Abnahme glyoxysomalen Proteins vortäuschen können^{22,28)}.

Newcomb und Trelease^{17,6)} vertreten die These einer einheitlichen Organellenpopulation mit selektivem Enzymumbau, da bisher keinerlei Anhaltspunkte für eine Degradation von Glyoxysomen oder Neubildung von Peroxisomen im Elektronenmikroskop zu beobachten waren; darüberhinaus ergeben spezifische cytochemische Reaktionen auf Malatsynthese und Glykolatoxidase zu einem Zeitpunkt, an dem in Homogenaten beide Enzyme nebeneinander nachweisbar sind, eine Identität zwischen Organellen, die auf Katalase, Malatsynthese und Glykolatoxidase anfärben.

Parallel dazu werden von anderen Autoren Mechanismen selektiver Enzymdesaktivierung am Beispiel der Isocitratlyase diskutiert^{29,30)}.

3. Mikrokörper - Membranen

Untersuchungen zum Glyoxysomen - Peroxisomen - Übergang

werden auch auf die Mikrokörper - Membran ausgedehnt. Mit diesem zweiten Parameter erhofft man sich die Beantwortung der Frage nach Umbau oder Neusynthese, da mit löslichen Enzymen zwar der Effekt der Differenzierung beschrieben werden kann, aber eine Aussage über die Identität der einhüllenden Membran nicht möglich ist.

Neben Versuchen zur unspezifischen Dichtemarkierung der Mikrokörpermembran mit D_2O ³¹⁾, mit der gegen eine Neusynthese argumentiert wird, werden insbesondere "pulse - chase" - und $^{14}C/^3H$ - Doppelmarkierungsversuche mit Cholin als Vorläufer für Mikrokörper - Membranlipid ³²⁾ durchgeführt und als Hinweis auf de novo - Synthese gewertet. ^{33, 34)}

Darüberhinaus finden die Proteinkomponenten der Mikrokörpermembran verstärkt Beachtung. Diese lassen sich nach methodischen Gesichtspunkten in 3 Gruppen unterteilen ³⁵⁾: lose assoziierte Enzyme, die bei Pufferbehandlung abdissoziieren; membrangebundene Enzyme, zu deren Solubilisierung mittlere bis hohe Salzkonzentrationen nötig sind; und übrige Proteine, gekennzeichnet durch ihre Unlöslichkeit, die als Membran - oder integrierte Proteine bezeichnet werden und nur bei Detergenz - Behandlung einer Analyse zugänglich sind. So erschienen während der Durchführung dieser Arbeit Publikationen, in denen die Enzyme der β - Oxidation und Malatsynthese und Citratsynthese in Rizinus-Glyoxysomen als membrangebunden klassifiziert werden ⁹⁾ sowie die Membranproteine bei Rizinus Glyoxysomen ^{35, 36, 37)} und Kürbis Glyoxysomen und Peroxisomen ³⁵⁾ elektrophoretisch in Natriumdodecylsulfat aufgetrennt werden. Der angestellte Vergleich zwischen Glyoxysomenmembranprotein und dem Proteinmuster des endoplasmatischen Retikulums ³⁷⁾ wird als ein weiteres Indiz für die ontogenetische Beziehung zwischen Glyoxysomenmembran und endoplasmatischem Retikulum gewertet.

II. Methoden

1. Pflanzenmaterial

Linsensamen (Lens culinaris L.) werden 8 Std. in Leitungswasser bei 20°C angequollen, 5 min mit einer 1 : 20 verdünnten Natriumhypochlorit - Lösung (Roth) oberflächensterilisiert, mehrfach mit Wasser nachgewaschen und auf feuchten Vermiculit ausgesät. Die keimenden Samen werden 5 Tage lang bei 18° und 100% Luftfeuchtigkeit im Dunkeln gehalten und dann bei 20° und ca. 80% Luftfeuchtigkeit 7 - 14 Tage unter Licht angezogen. Es werden Tageslichtneonröhren bei einer Lichtstärke von 6000 Lux in einem Tag - Nacht - Rhythmus von je 12 Std. verwendet.

2. Organellen - und Membrantrennungen durch Dichtegradientenzentrifugation

a) Thylakoide, Mitochondrien, Peroxisomen

Bei der Wahl der Methode des Homogenisierens muß ein Kompromiß zwischen einerseits schonender, andererseits mengenmäßig aber praktikabler Aufarbeitung des Pflanzenmaterials gefunden werden. Während sich kleine Mengen Blätter mit Rasierklingenschneidern mit hoher Ausbeute an intakten Organellen manuell aufarbeiten lassen (z.B.³⁴⁾), wird bei größeren Mengen folgendermaßen verfahren:

50 - 500 g Laubblätter werden in 50 g - Portionen bei 0° - 4°, wie bei allen folgenden Operationen, 20 sec lang bei halber Leistung in einem Waring Blendor mit jeweils 100 ml eines Saccharosemediums homogenisiert; dieses "grinding medium" (GM) besteht aus:

30 % (w/w) Saccharose - Lösung, mit 150 mM Tris/HCl,
p_H 7.5, angesetzt
10 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 mM Dithiothreitol.

Das resultierende Homogenat wird durch eine doppelte Lage Miracloth filtriert und der Rohsaft einer Differential-zentrifugation unterworfen, um von Zelltrümmern, Stärke und Plastiden abzutrennen und zugleich eine Rohorganellenfraktion anzureichern. Nach 10 min Zentrifugation bei 1500 x g in einem Sorvall SS 34 - Rotor (= 3500 rpm) wird aus dem Überstand durch Zentrifugation bei 15 000 x g (= 13 000 rpm) ein Rohorganellenniederschlag gewonnen. Dieser wird mit Hilfe eines weichen Pinsels vorsichtig in 40 ml GM suspendiert und die Saccharosedichte auf 43.5 % erhöht, indem langsam über einen Zeitraum von 20 min 70 %-ige Saccharose hinzugefügt wird.

Die Auftrennung der Organellen nach ihren Schwebedichten in einem Saccharosegradienten erfolgt in einem Zonenrotor der Ultrazentrifuge (TI 14 oder 15; Beckman Spinco L 65 B). Die Organellensuspension wird in den vorgeformten Gradienten bei einer Dichte eingepumpt, bei der ein Teil der Organellen bzw. Membranen flotiert (Thylakoide), ein anderer Teil sedimentiert (Peroxisomen).

Der Gradient wird aus 30 % (w/w) und 60 % Saccharose (mit 40 mM Tris/HCl, p_H 7.5, angesetzt; 1 mM EDTA) diskontinuierlich mit Hilfe eines Gradientenformers (ISCO) hergestellt; Einstellungen zur Pumpensteuerung am Gerät: 0, 15, 30, 45, 50, 53, 56, 60, 65, 70, 100. Das Einpumpen in den laufenden Rotor wird bei einer dem Saccharosegehalt der zu trennenden Organellensuspension entsprechenden Dichte (43.5 %; etwa bei Erreichen der Einstellung "45") unterbrochen und die Suspension auf den Rotor aufgebracht; dann wird das Programm, das insgesamt 40 min dauert, fortgesetzt und der Rotor mit dem Restgradienten gefüllt.

Der Lauf wird 5 Std. bei 48 000 rpm (TI 14; max. 172 000 x g) durchgeführt. Der Gradient wird mit 60 % Saccharose aus dem Rotor gedrückt, fraktioniert und analysiert.

b) Peroxisomen - Membran

Gradientenfractionen mit höchster Katalaseaktivität werden vereint, mit dem gleichen Volumen Eiswasser versetzt und die osmotisch geschockten Partikel bei 40 000 rpm in der Ultrazentrifuge sedimentiert (Rotor 50 TI oder 60 TI; ca. 100 000 x g). Der Überstand enthält die löslichen Matrixenzyme. Den Membranniederschlag nimmt man schonend mit einem Pinsel in 6 ml GM auf und überschichtet die Suspension auf einen Gradienten.

Alternativ: Der Membranniederschlag wird 10 sec lang mit 6 ml GM in einem hochtourigen Mixer (Ultraturrax) zerschlagen und dann auf den Gradienten aufgetragen.

Der Gradient besteht entweder aus 6 gleichgroßen Stufen von 60, 52,46, 44, 41 und 35 % Saccharose oder er ist linear zwischen 60 % und 30 %; Rotor SW 27 oder SW 40, Zentrifugationsdauer 5 Std. Nach dem Lauf wird der lineare Gradient fraktioniert, die Grenzsichten des Stufengradienten mit einer Kanüle entnommen und die Fraktionen weiter analysiert.

c) Mikrosomen - Endoplasmatisches Retikulum

Zur Gewinnung einer Mikrosomenfraktion geht man von dem 15 000 x g - Überstand der Differentialzentrifugation aus, der mit Puffer (Tris/HCl 40mM, p_H 7.5) auf eine Saccharosedichte von ca. 17 % gebracht wird. In einem ersten Schritt, der zugleich auch der Ankonzentrierung der Membransuspension für spätere Operationen dient, wird eine Mikrosomen-Subfraktion durch Geschwindigkeitszentrifugation über einen Stufengradienten gewonnen. In ein 38.5 ml SW 27 - Zentrifugenröhrchen überschichtet man nacheinander: 4 ml 30 %, 4 ml 20 % Saccharose, 30 ml des 15 000 x g - Überstandes mit 17 % Saccharosedichte, und zentrifugiert 1 Std.

bei 27 000 rpm (SW 27). Die Saccharoselösungen sind mit 40 mM Tris/HCl - Puffer, p_H 7.5, angesetzt und 1 mM an EDTA.

Nach dem Lauf wird aus 6 identischen Röhrchen jeweils die Grenzschicht zwischen der 20 % und 30 % Saccharose mit einer Kanüle entnommen, die nunmehr fast farblose Membransuspension wieder auf 17 % Saccharose gebracht und erneut über einen identischen Stufengradienten zentrifugiert. Die Grenzschicht zwischen 20 % und 30 % Saccharose wird nach Verdünnen auf 17 % auf einen linearen Saccharosegradienten (17 % - 37 %) aufgetragen. Dieser wird im SW 27 - Rotor 2 Std. bei 27 000 rpm (max. 131 000 x g) zentrifugiert, anschließend fraktioniert und weiter analysiert.

3. Proteintrennungen

a) Säulentrennungen

Säulentrennungen von Membranproteinen nach dem Prinzip der Gelfiltration werden in einem Natriumphosphat - Puffer 25 mM, p_H 7.2, in Anwesenheit von 0.1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) bei Zimmertemperatur durchgeführt. Als Trennmateriel erweist sich Sepharose 4 B (Pharmacia) als geeignet, die zuvor mit dem Elutionspuffer äquilibriert wird. Das Ausschlußvolumen der Säule wird durch Zugabe von 5 - 20 μ l Zeichentusche, der Bereich des Niedermolekularen durch Bromphenolblau markiert.

Probenvorbereitung: Membran - oder Organellenniederschläge werden in bestimmten Fällen zur spezifischen Abtrennung störender Proteine (vgl. S.46) als Suspension 1/2 Std. bei 0° in 0.2 M KCl inkubiert, bei 100 000 x g . 30 min. zentrifugiert, mit Puffer (Tris/HCl 20 mM, p_H 7.5)

gewaschen und erneut zentrifugiert; anschließend werden die Membranen durch Erhitzen in SDS aufgelöst und dabei die Proteine in SDS - Komplexe überführt.

Beladen der Proteine mit SDS: SDS - Protein - Komplexe zeigen eine durchschnittliche SDS - Protein - Relation von 1.4 g SDS / g Protein (vgl. S.16). Membranen werden in 5 % SDS, Na-phosphat 5 mM, p_H 7.2, in einer Endkonzentration aufgelöst, die einem SDS / Protein - Verhältnis von 3 : 1 entspricht, und mit β - Mercaptoäthanol (Endkonzentration 1 %) versetzt (vgl. auch S.16). Man erhitzt das Gemisch für 2 min auf 100° ³⁹⁾ und fällt die Proteine bzw. SDS - Komplexe bei Zimmertemperatur mit Aceton ⁴⁰⁾ (Endkonzentration 80 %), um Lipide zu entfernen. Nach Zentrifugation in einer Tischzentrifuge wird der Proteinniederschlag erneut in gepufferter 5 % SDS - Lösung bei einem Protein / SDS - Verhältnis von 1 : 1.4 aufgenommen, mit β - Mercaptoäthanol versetzt (Endkonzentration 0.1 %), für 2 min auf 100° erhitzt und nach Abkühlen auf die Sepharosesäule aufgetragen.

Säulendimensionen und Trennkapazität: Die Säulenabmessungen sind etwa Länge : Durchmesser = 15 : 1; die zu trennende Proteinmenge liegt für Säulenvolumen zwischen 5 ml und 400 ml in der Regel bei 0.1 mg pro ml Säulenmaterial und kann bei groben Vortrennungen auch 0.6 mg /ml Säulenvolumen betragen.

b) Elektrophoretische Trennungen

Elektrophoretische Trennungen von Membranproteinen unter denaturierenden Bedingungen und / oder unter Anwesenheit von Detergentien werden in Polyacrylamid - Gelen (PAG) durchgeführt.

α) SDS - PAG - Elektrophorese

SDS fungiert als Lösungsvermittler für hydrophobe Proteine; darüberhinaus dissoziiert es Proteinkomplexe in ihre einzelnen Polypeptidketten und überführt sie unter Denaturierung in ihre SDS - Komplexe mit einer hohen negativen "Überschußladung von etwa 1 Molekül SDS pro 2 Aminosäuregruppen^{38,39,41)}, so daß ursprüngliche Eigenladungen ionischer Reste in den Hintergrund treten. Somit besitzen die Proteine pro Masseneinheit eine uniforme negative Ladung und einheitliche hydrodynamische Struktur, die im elektrischen Feld nicht nur ihre Auftrennung, sondern auch im Vergleich mit Standardproteinen eine Bestimmung ihrer Molekulargewichte zulassen.

Die dissoziierende Wirkung kann durch Harnstoff noch erhöht werden; durch Zugabe von β - Mercaptoäthanol werden intramolekulare Disulfidbrücken durch Reduktion gespalten.

Vorbereitung der Proben: Aliquote von Membransuspensionen, von Proteinniederschlägen nach Acetonfällung (vgl. S.46) oder von Säuleneluatens mit einem Proteingehalt von 10 - 200 μ g (reine Proteine 10 - 50 μ g, Gemische 80 - 200 μ g) werden in 10 - 40 μ l eines Extraktionsmediums (EM) unter Beachtung der für optimale SDS - Beladung notwendigen SDS-Protein - Relation (vgl. S.15) gelöst.

Das EM besteht aus Na-phosphat - Puffer, 25 mM, p_H 7.2; 8 M Harnstoff; 2 % SDS.

Nach Zugabe von β - Mercaptoäthanol (Endkonzentration 1 %) wird 2 min lang (alternativ: 30 min) auf 100° erhitzt³⁹⁾ und 5 μ l einer 0.01 % Bromphenolblau - Lösung als Frontmarkierung hinzugefügt.

Bereitung des Gels: Es wird die Flachgelapparatur nach Stegemann⁴²⁾ verwendet, die den gleichzeitigen Lauf von 8 Proben in einem analytischen Gel von 3 mm Dicke oder

verschiedene präparative Gelstärken ermöglicht.

Die Gelmischung wird aus Stammlösungen, die bei 4° im Dunkeln aufbewahrt werden, bereitet ^{43,39)} und die Polymerisation durch Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat gestartet.

<u>Komponente</u>	<u>Endkonzentration</u>
Acrylamid	4.75 %
mit N,N'-Methylenbis-acrylamid	0.25 %
N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin	0.07 %
Na-sulfit	0.035 %
Na-phosphat - Puffer p _H 7.2	0.025 M
mit SDS	0.1 %
Ammoniumperoxodisulfat	0.04 %

Neben diesem Standardgel werden auch Gelmischungen unter Zusatz von Harnstoff (bis 8 M) hergestellt.

Analytisches Gel: Der Lauf wird bei 15° und 100 mA / 150 V als kontinuierliche Elektrophorese (Elektrodenpuffer = Gelpuffer) durchgeführt und ist nach 4 Std. beendet, wenn der Farbstoff Bromphenolblau ca 4/5 der Gellänge durchlaufen hat. Um p_H - Verschiebungen in den Elektrodenpuffern zu vermeiden, wird während des Laufs der Puffer zwischen beiden Elektrodenräumen umgewälzt.

Das Gel wird entnommen, die Front mit Tusche markiert, das Gel mit Coomassie Blue R 250 angefärbt und anschließend überschüssiger Farbstoff durch Diffusion entfernt.

Alternativ: Es werden fluoreszenzmarkierte Proteine unter der UV - Lampe sichtbar gemacht und ihre Lage markiert. Es wird ein Test auf Glykoproteine durchgeführt (vgl. S.27).

Entfärbte Gele werden mit einem orange Filter über einer homogenen Lichtquelle im Durchlicht fotografiert und gegebenenfalls zur Radioaktivitätszählung in kleine Segmente geschnitten (vgl. S.29).

Präparative Gele (3 mm - Gele) kann man mit bis zu 2 ml Probenvolumen mit ca. 10 mg Protein beladen. Proteinzonen werden entweder durch Vergleich der relativen Mobilitäten oder bei vorheriger Fluoreszenzmarkierung unter der UV - Lampe lokalisiert und herausgeschnitten.

Man zerkleinert die Gelsegmente, indem man sie mehrfach durch eine Plastikspritze ohne Kanüle preßt, und eluiert 3 - 5 mal jeweils mit gleichem Volumen des Elektrodenpuffers. Die vereinigten Eluate werden lyophilisiert und gegen 1 %ige SDS - Lösung dialysiert und mit Aceton gefällt.

Alternativ: Aus kleinen Mengen proteinhaltigem PAG kann das Protein herauselektrophoretisiert werden ⁴⁴⁾.

"Diskontinuierliches" SDS - Gelsystem: Ein SDS - PAGE - System ⁴⁵⁾ wird zum Vergleich angewendet, bei dem vor dem Lauf der Anodenpuffer auf p_H 4.1, der Kathodenpuffer auf p_H 11.4 gebracht wird.

Molekulargewichtsbestimmung: Zur Bestimmung der Molekulargewichte (MW) unbekannter Proteine werden deren relative Mobilitäten auf dem Standardgel mit denen von Standardproteinen bekannten MW verglichen. Es gilt dabei, daß die Logarithmen ihrer MW ihren relativen Mobilitäten umgekehrt proportional sind ⁴⁶⁾ (Bezugspunkt: Bromphenolblau).

Als MW - Marker kommen zur Anwendung ^{39,47)}:

Protein, Herkunft	MW der Untereinheit $\times 10^{-3}$	rel. Mobil. Mittelwert
β -Galaktosidase, E.coli	130	0.233
Phosphorylase, Muskel	96	0.302
Serumalbumin, Rind	68	0.460
Katalase, Leber	58	0.510
Alkoholdehydrogenase, Hefe	37	0.690
Carboanhydrase, Erythrozyten	29	0.828
Cytochrom c, Muskel	12.4	1.06

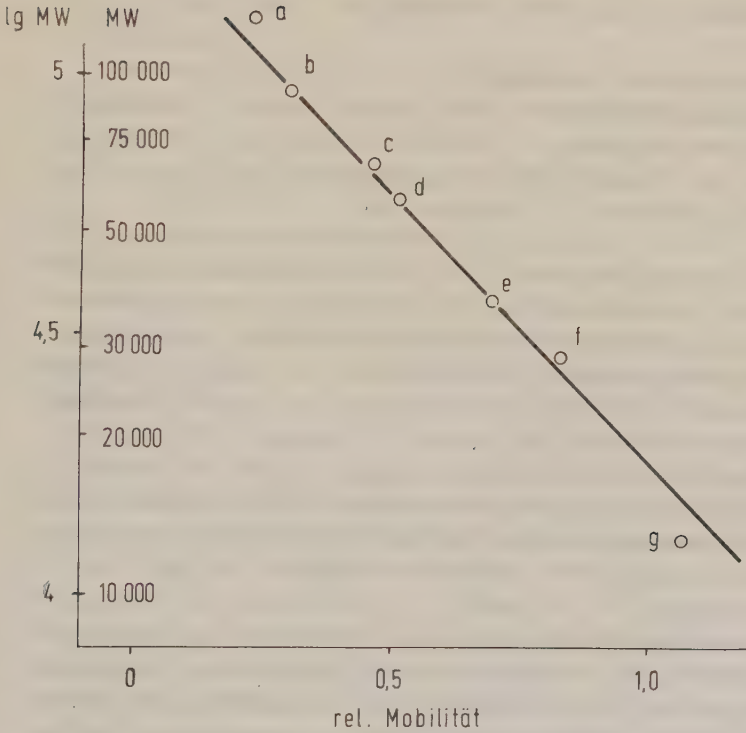


Abb. 1 : Eichkurve für das SDS - Standard - Gel;
Molekulargewichtsmarker - Proteine a - g:
siehe S. 32

Die graphische Auswertung (Abb. 1) zeigt, daß das verwendete PAG - System mindestens zwischen MW 100 000 und 25 000 linear und zur Bestimmung von Molekulargewichten geeignet ist.

β) Harnstoff - und Triton - PAGE

Die Gele werden, ausgehend von der für SDS - Gele beschriebenen Gelmischung, unter Ersatz des SDS - Puffers gegen einen Tris/Borat - Puffer, 0.125 M, p_H 8.9, und Zugabe von Harnstoff (8M) oder Harnstoff (8 M) und Triton X - 100 (1 %, w/w) ⁴⁸⁾ hergestellt.

Proben für das Harnstoff - Gel werden entweder durch Extraktion von Membranen mit 8 M Harnstoff (siehe S.26) oder durch Entfernen des Detergenz aus SDS - haltigen Proteinlösungen gewonnen. Die Methodik, SDS durch Tris/Acetat-äquilibrierten Anionenaustauscher aus Harnstoff - haltigen Detergenzlösungen zu entfernen ⁴⁹⁾, erweist sich für das untersuchte Protein als nicht gangbar, da es im "batch" - wie im Säulenverfahren nicht mehr von dem Austauscher eluiert. So werden die SDS - Proben 2 mal 12 Std. gegen Harnstoff in Tris/Borat - Puffer dialysiert.

Proben für das Triton/Harnstoff - Gel werden aus Membransuspensionen mit einer Lösung von 1 % Triton in Puffer mit 8 M Harnstoff, 5 mM Dithiothreit ⁴⁸⁾ extrahiert oder durch Dialyse SDS - haltiger Proteinlösungen gegen dieses Medium weitgehend von SDS befreit.

γ) Isoelektrische Fokussierung in PAG unter denaturierenden Bedingungen

Proteine wandern in einem p_H - Gradienten unter Einfluß eines elektrischen Feldes zu einem p_H - Wert, der ihrem

isoelektrischen Punkt entspricht; ihre Nettoladung ist an diesem Punkt gleich Null, da sich positive und negative Ladungen kompensieren. Der p_H - Gradient wird durch Ampholyte (Ampholine, LKB) aufrechterhalten.

Gelzusammensetzung: Die zylindrischen Gele (Durchmesser 0.6 cm, Länge 12 cm) werden photopolymerisiert ⁵⁰⁾ und bestehen aus:

<u>Komponente</u>	<u>Endkonzentration</u>
Acrylamid	4.75 %
mit N,N'-Methylenbis- acrylamid	0.25 %
N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin	0.1 %
Ammoniumperoxodisulfat	0.015 %
Riboflavin	0.0005 %
Ampholine p_H 3.5-10, 40%ige Lösung	1 %
Harnstoff	8 M
Triton X - 100	1 %

Durchführung des Laufs: Die Proben werden in 100 μ l einer Lösung von 8 M Harnstoff, 1 % Triton und 1 % Ampholine aufgenommen, auf die Gele aufgetragen und mit 50 μ l einer Lösung von 4 M Harnstoff, 1 % Triton und 1 % Ampholine überschichtet. Der Lauf wird in einer Disk - Elektrophorese - Apparatur (WTW) bei 20° durchgeführt; als Kathodenlösung (oben) verwendet man 0.02 M NaOH, als Anodenlösung 0.01 M H_3PO_4 .

Sollen SDS - haltige Proben verwendet werden, wird vorher 24 Std. gegen 8 M Harnstoff, 1 % Triton dialysiert und gegebenenfalls auf ein Volumen unter 50 μ l ankonzentriert.

Nach einem Anfangsstrom von 9 mA bei 100 V für 9 Gelröhrchen wird nach 30 min 9 mA/200 V erreicht. Bei konstanter Spannung wird der Lauf über 6 oder 12 Std. durchgeführt,

gegen Ende liegt die Stromstärke bei < 1 mA.

Die Gele werden am Boden mit Tusche markiert und 2 mal 24 Std. in 8 %iger Trichloressigsäure geschüttelt, um das Ampholine zu entfernen, das die folgende Anfärbung stören würde. Weitere Schritte des Anfärbens, wie auf S. 17 beschrieben.

p_H - Bestimmung im Gel: Ein identisch behandeltes Gel ohne Proteinprobe wird direkt nach dem Lauf in 16 Segmente zerschnitten, von denen jedes mit 1 ml dest. Wasser durch eine Plastikspritze gedrückt wird. Nach gelegentlichem Schütteln der Suspension wird nach ca. 1 Std. in dem wässrigen Überstand mit einer geeichten Glaselektrode der p_H - Wert gemessen.

c) Geschwindigkeitszentrifugation im Dichtegradienten unter denaturierenden Bedingungen

Das gereinigte, kovalent radioaktiv markierte Protein (vgl. S.24) wird als SDS - Komplex mit fluoreszenzmarkierten Molekulargewichtsmarkern auf einen 7 % - 30 % linearen Saccharosegradienten, der 0.1 % SDS, 25 mM Na-phosphat, p_H 7.2, enthält, aufgetragen und im Rotor SW 40 65 Std. zentrifugiert. Nach dem Fraktionieren werden die Saccharosedichte, Radioaktivität, Protein und Fluoreszenz bestimmt.

d) Ankonzentrierung SDS - haltiger Proteinlösungen

Neben der oben erwähnten Methode der Fällung mit Aceton, die erst bei Konzentrationen ab 1 mg Protein / ml Lösung mit Erfolg anzuwenden ist, und neben dem elektrophoretischen Verfahren (vgl. S. 18) werden große Volumina (> 5 ml) durch Gefriertrocknung und anschließende Dialyse gegen

den Elutionspuffer ankonzentriert, mittlere Volumina durch Ultrafiltration in Minicon B 15 - Zellen (Amicon), kleine Volumina (< 1 ml) im Visking - Dialyseschlauch (8/32), der zum Entzug des Wassers und anderer niedermolekularer Bestandteile mit einer Schicht trockenen Sephadex G - 100 umgeben wird. Diese Methode eignet sich insbesondere, als anschließend in der gleichen Membran dialysiert werden kann.

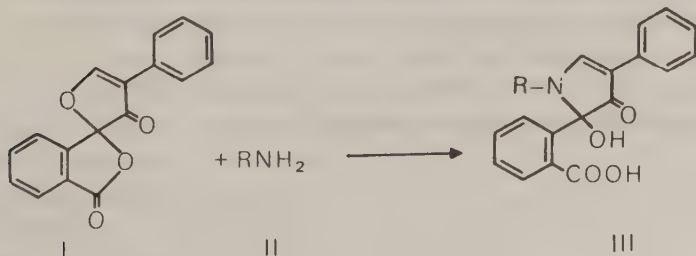
4. Proteinmarkierungen

Zur besseren Handhabung und einfachen Verfolgung von PAG - Trennungen, besonders präparativen, lassen sich Proteine, denen keine enzymatische Aktivität zuzuordnen ist oder die mit denaturierenden Agentien behandelt wurden, leicht kovalent markieren.

a) Fluoreszenz

10 - 100 μ g Protein in SDS - Puffer, p_H 7.2, werden mit 5 μ l Fluram - Lösung (Hoffmann-La Roche), 1 mg / 200 μ l Aceton, unter kräftigem Schütteln versetzt ^{52,53}).

Bei Proteingemischen für präparative Trennungen wird nur 1/10 der Proteinmenge analog umgesetzt und danach wieder mit der Hauptmenge vereint.



Fluram (I) reagiert mit primären Aminogruppen (II) zu intensiv fluoreszierenden Verbindungen (III); der Überschuß des Reagenz hydrolysiert; weder Ausgangs - noch Hydrolyseprodukt fluoreszieren. λ Anregung = 390 nm

Es ist sichergestellt, daß in der SDS - PAGE bei dem untersuchten Protein durch Derivatisierung kein verändertes Laufverhalten auftritt (siehe Abb. 14; vgl. auch ⁵⁴).

b) Radioaktivität

[³⁵S] - Sulfanilsäure wird mit Isoamylnitrit diazotiert ⁵⁵); das Reaktionsprodukt kuppelt unspezifisch an Proteine ⁵⁶).

0.1 μ Mol [³⁵S] - Sulfanilsäure (5.7 Ci / mMol, wässrige Lösung; Amersham) wird lyophilisiert, mit 2 μ l 1 N HCl und 300 μ Mol Isoamylnitrit (50 μ l) bei 4° versetzt und nach 30 min lyophilisiert. Der Rückstand wird bei 4° mit 60 μ l Na-phosphat - Puffer, 50 mM, p_H 7.2, aufgenommen; Aliquote von 10 μ l werden bei Zimmertemperatur sofort mit Proteinen in SDS - Lösung oder mit Membransuspensionen umgesetzt.

Bei einem Gesamtvolumen von 110 μ l (10 μ l Reagenz, 100 μ l Proteinprobe) liegen 16.4 nMol = 93.5 μ Ci diazotierter Sulfanilsäure in einer Konzentration von 150 μ M vor.

Nach 30 min Inkubation wird in SDS - Proben das Protein mit Aceton gefällt, erneut in SDS aufgenommen und dialysiert; Membransuspensionen werden zentrifugiert.

Bei der SDS - PAGE zeigt das so derivatisierte SP-63 keine veränderten Laufeigenschaften (Abb. 17).

5. Weitere Proteincharakterisierungen

a) Löslichkeitsverhalten

Um zu prüfen, durch welche Medien das Hauptprotein der Peroxisomenmembran löslich erhalten werden kann, werden jeweils 100 µg Membranprotein bei 0° - 4° 30 min lang mit verschiedenen Salz - und / oder Detergenzlösungen oder organischen Lösungsmitteln in einem Volumen von 500 µl behandelt. Das Membranprotein wird dazu entweder als Suspension (10 µl) intakter Membranen eingesetzt oder als Proteinniederschlag nach Acetonfällung von Membranen.

Als löslich werden dabei Proteine definiert, die bei anschließender Zentrifugation (30 min bei 100 000 x g; 50 TI, Reduktionseinsätze) im Überstand bleiben (bei organischen Lösungsmitteln Tischzentrifuge 5000 rpm)

Überstand und Niederschlag werden ohne weitere Aufteilung als Gesamtheit für eine SDS - PAGE vorbereitet, indem sie in Visking Dialysierschläuche überführt werden, die Überstände auf ein Volumen unter 50 µl ankonzentriert und Überstände und Niederschläge zum Entfernen von Salz und Detergenz 24 Std. bei Raumtemperatur gegen Elektrodengpuffer dialysiert werden. Gegebenenfalls wird erneut kurz ankonzentriert, um ein Volumen von 20 µl oder weniger zu erreichen. Man entnimmt die Lösung, spült mit 20 µl EM nach und überführt in die SDS - Komplexe, wie unter "SDS - PAG - Elektrophorese" beschrieben.

Organische Phasen werden unter einem Stickstoffstrom verdampft und der Rückstand direkt im EM aufgenommen.

Folgende Agentien werden auf ihre Fähigkeit zur Solubilisierung getestet:

Mit Membransuspensionen:

Aceton 80 %

Butanol / Wasser 1 : 1

Chloroform / Methanol / Wasser 2 : 1 : 1

KCl 0.2 M

KCl 1 M

KCl 1 M mit 0.1 mg Cholat / mg Protein

Cholat 0.1 %

Triton X - 100 0.1 %

Harnstoff 8 M

Guanidiniumchlorid 6 M

Mit Proteinniederschlägen nach Acetonfällung von Membranen:

Chloroform / Methanol 2 : 1

Triton X - 100 0.1 %

Harnstoff 8 M

Guanidiniumchlorid 6 M

(Wässrige Phasen jeweils gepuffert mit Na-phosphat 50 mM,
p_H 7.5)

b) Aminosäuren - Zusammensetzung

Die Aminosäurenzusammensetzung des gereinigten Proteins in SDS wird mit einem Beckman Multichrom c - Analysator als Zweisäulenanalyse durchgeführt ⁵⁷⁾ .

300 µg Protein in 500 µl Na-phosphat - Puffer, 25 mM, p_H 7.2, 0.1 % SDS, werden mit 750 µl 10 N HCl p.a. unter Argon 22 Std. lang bei 110° hydrolysiert. Zur Erfassung des Tryptophans wird eine Hydrolyse in Anwesenheit von Thioglykolsäure (5 %) durchgeführt.

Die quantitative Auswertung der Chromatogramme erfolgt durch Vergleich der integrierten Peaks mit den Werten für ein Standardgemisch von Aminosäuren äquimolarer Zusammensetzung.

c) Glykoprotein - Test

Neben seiner eigentlichen Aussage ist der Test auf Glykoproteine von Bedeutung für Molekulargewichtsbestimmungen auf SDS - PAG, weil Glykoproteine anomale Detergenz - Beladung und somit verändertes Laufverhalten aufweisen ³⁹⁾.

Der Test wird im Gel nach SDS - Lauf und nach Oxidation mit Perjodat mit fuchssinschwefliger Säure ⁵⁸⁾ durchgeführt. Als positive Kontrolle dient Glucoamylase aus *Rhizopus niveus*.

6. Quantitative Bestimmungen

a) Enzyme

Die Bestimmung der Leitenzyme wird mit einem Gilford Spektralphotometer bei 20° nach Literaturmethoden durchgeführt.

α) Katalase (E.C. 1.11.1.6)

Meßprinzip: H_2O_2 - Zersetzung

$$\epsilon_{240} = 0.036 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol} \quad 59)$$

β) Fumarase (E.C. 4.2.1.2)

Bildung von Fumarat aus L-Malat

$$\epsilon_{240} = 2.5 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol} \quad 60)$$

γ) NADH - Cytochrom c - Reduktase (E.C. 1.6...)

Reduktion von Cytochrom c

$$\epsilon_{550} = 21.1 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol} \quad 22)$$

δ) Malatsynthese (E.C. 4.1.3.2)

Kondensation von Glyoxylat mit Acetyl - Coenzym A und Reaktion der -SH - Gruppe mit Ellman's Reagenz

$$\epsilon_{412} = 13.3 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$$

b) Proteinbestimmung

Proteine werden nach Lowry et al. ⁶¹⁾ bestimmt. Es werden Proteinlösungen bis 200 μ l und bis 200 μ g zum Test eingesetzt, die Eichung wird mit Rinderserumalbumin vorgenommen. Bei Komponenten, die den Test stören (z.B. reduzierende Substanzen, hohe Ionenstärken, Detergentien, Harnstoff, hohe Saccharosekonzentrationen), werden die Proteine mit 1 ml 8 %iger Trichloressigsäure gefällt, mindestens 4 Std. zur Vervollständigung der Fällung bei 4° stehengelassen und anschließend in einer Tischzentrifuge sedimentiert.

Test - Endkonzentrationen (Volumen 1.1 - 1.3 ml) von 0.01 % SDS und von 1 % Saccharose stören nicht.

Extinktionen werden am PMQ II (Zeiss) gemessen; zur Aufnahme von Spektren wird ein Cary 15 benutzt.

c) Chlorophyll - Bestimmung

Zur Bestimmung der Chlorophyll - Maxima in Gradienten werden Fraktionen geeignet mit Wasser verdünnt und ihre Extinktion bei 660 nm im Photometer (Zeiss) gemessen.

d) Saccharose - Bestimmung

Der Saccharosegehalt wird refraktometrisch bestimmt; alle Angaben in dieser Arbeit verstehen sich als Gewichtsprozente (w/w).

Zu Vergleichszwecken sind für bestimmte Saccharosekonzentrationen die Werte auch in % (w/v) und die Dichte (4°C) aufgeführt ⁶²⁾ :

Saccharosekonzentrationen in

<u>% (w/w)</u>	<u>% (w/v)</u>	<u>Dichte g/cm³ (4°C)</u>
17	18.1	1.068
28	31.3	1.117
30	33.8	1.127
40	47.0	1.176
42	49.8	1.187
44	52.7	1.197
46	55.6	1.208
48	58.5	1.219
50	61.5	1.229
60	77.2	1.286

e) Radioaktivitätsbestimmung

α) Wässrige Lösungen werden mit 10 ml Szintillator versetzt und die Radioaktivität nach der Methode des externen Standardkanalverhältnisses in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard) gemessen.

Als Szintillator wird folgende Mischung verwendet ⁶³⁾ :

1 Liter Toluol p.a.

200 ml Scintisol G. P. (Isolab)

5 g 2-(4-tert. Butylphenyl)-5-(4-biphenyl)1,3,4-oxadiazol

β) Polyacrylamid - Gele werden nach Fraktionierung in 3mm starke Scheibchen entweder mechanisch homogenisiert oder naßchemisch oxidiert und anschließend wie oben die Radioaktivität gemessen.

- Die Gelscheibchen werden mit 0.5 ml 0.8% SDS durch eine Plastikspritze ohne Kanüle gepresst und in Szintillationsgläschen über Nacht zur weiteren Elution geschüttelt.

- Die Gelmatrix wird mit 200 µl Perchlorsäure, 70 %, und 500 µl H₂O₂, 30 %, bei 70° 2 Std. lang in verschlossenen Szintillationsgläschen oxidativ zerstört ⁶⁴⁾ .

III. Ergebnisse

1. Auftrennung von Zellorganellen und Membranen in Dichtegradienten und der Vergleich der Proteinmuster der Membranen

Zum Vergleich verschiedener Verfahren zum Zerkleinern des Pflanzenmaterials wird der partikelgebundene, sedimentierbare Katalase - Anteil als Maß für unbeschädigt aus dem Gewebe freigesetzte Peroxisomen bestimmt.

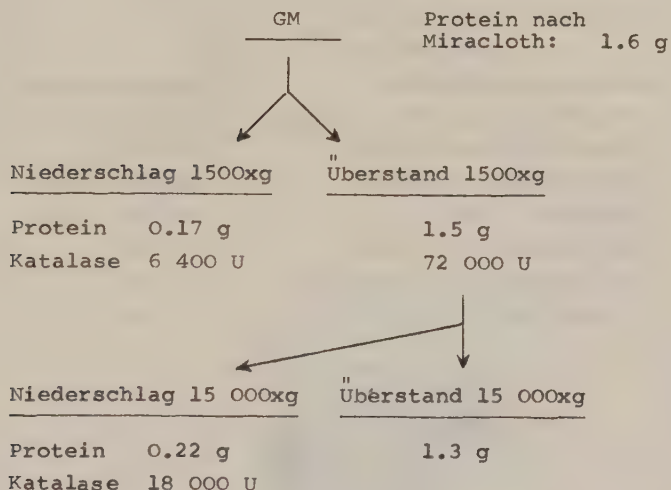
Je 2.5 g Linsen - Laubblätter werden in gleichen Volumina GM entweder mit einem Skalpell 5 min handgeschnitten oder in einem Mixer 20 sec bei 100 V homogenisiert, durch Miracloth filtriert und bei 100 000 x g 30 min sedimentiert.

Methode	sedimentierbare Katalase, U	Anteil sedim. Katalase an Gesamtkatalase nach <u>Miracloth, %</u>
Skalpell, 5 min	435	58 %
Mixer, 20 sec	630	23 %

Tab. 1 : Effektivität der Homogenisationsmethoden

Während bei der Homogenisation mit einem Mixer die Peroxisomen relativ stärker geschädigt werden, ist die Absolutausbeute an partikelgebundener Katalase größer, da insgesamt mehr Zellen aufgebrochen werden. Darüberhinaus ist für die hier beschriebene Problemstellung eine Unversehrtheit der Organelle nicht unbedingt Voraussetzung; Peroxisomenmembranen stellen sich auf dem Gleichgewichtsgradienten ohnehin bei gleicher Dichte wie die intakten Organellen ein (vgl. Abb. 5 und 6).

Die Relation von Katalase zu Gesamtprotein auf den einzelnen Stufen der Differentialzentrifugation zeigt das folgende Schema, bei dem 200 g Blätter aufgearbeitet werden, wie unter "Methoden" beschrieben.



Schema 1 : Katalase- und Proteinverteilung in den Differentialzentrifugationsschritten

Der 15 000 x g - Niederschlag, der das Ausgangsmaterial für die Zonenrotor - Gradiententrennung liefert, enthält bei alle Versuchen zwischen 20 % und 30 % der gesamten Katalaseaktivität nach Miracloth - Filtration.

Die folgende Abbildung zeigt das in SDS elektrophoretisch aufgetrennte Proteinmuster der Differentialzentrifugationsniederschläge. Aliquote mit einem Proteingehalt zwischen 80 und 120 µg werden direkt in SDS aufgenommen, wie unter "SDS - PAGE" beschrieben.

- 1 Niederschlag bei 1500 x g
- 2 " 15 000 x g
- 3 " 100 000 x g

M	Molekulargewichtsmarker	<u>Untereinheiten- MW</u>
a	β - Galaktosidase, E. coli	130 000
b	Phosphorylase, Muskel	96 000
c	Serumalbumin, Rind	68 000
d	Katalase, Leber	58 000
e	Alkoholdehydrog., Hefe	37 000
f	Carboanhydrase, Erythrozyten	29 000
g	Cytochrom c , Muskel	12 400

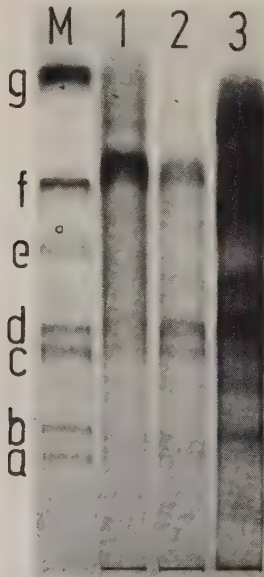


Abb. 2 : SDS-PAGE der Differentialzentrifug.-Niederschläge

Die Auftrennung der Organellen und Membranen auf einem Saccharosedichtegradienten im Zonenrotor zeigt Abbildung 3; es werden 200 g Laubblätter verwendet, deren 15 000 x g Niederschlag als Suspension bei 43.5 % Saccharose (↓) in den Rotor gepumpt wird.

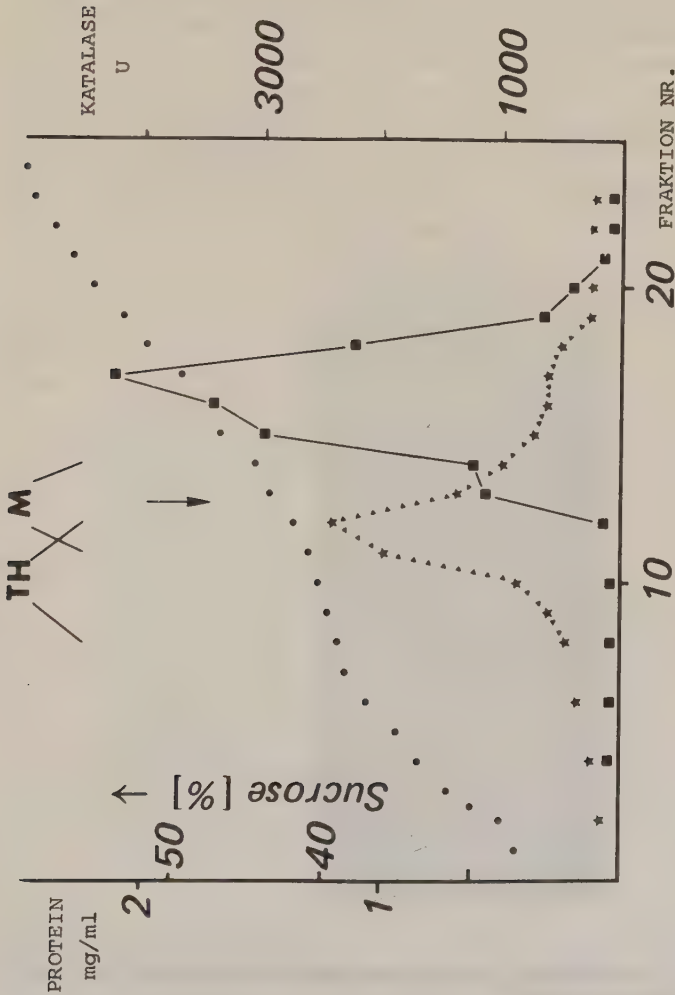


Abb. 3 : Organellentrennung auf Gleichgewichtsdichtegradienten
 ... Saccharose, --- Protein, ■■ Katalase; TH = Maximum
 Thylakoide (A_{660}) ; M = Maximum Mitochondrien (Fumarase)

Aliquote von Gradientenfraktionen des Katalasemaximums werden 1 : 1 verdünnt und bei 100 000 x g 30 min zentrifugiert. Der Niederschlag wird in SDS aufgenommen.

1 Fraktion 16 aus Abb. 3 , Katalase - Maximum

2 " " 18 "

4 Überstand von (1) nach osm. Schock, ankonzentriert, in SDS

3 Peroxisomenmembran nach ^{35}S -Sulfanilsäure-Behandlung und Gradientenreinigung, vgl. Abb. 5

M Markerproteine

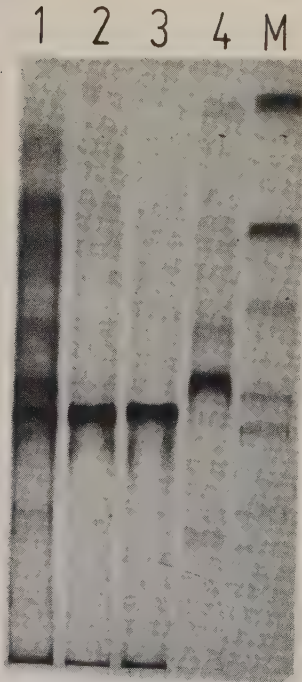


Abb. 4 : Proteinmuster der Peroxisomenmembran und der Matrix in SDS

Zur weiteren Reinigung wird ein Aliquot der Peroxisomenfraktion mit einem Katalasegehalt von 2800 U mit diazotierter ^{35}S - Sulfanilsäure markiert, 1 : 1 mit Wasser verdünnt und bei 100 000 x g zentrifugiert; danach wird der Niederschlag entweder schonend in GM aufgenommen (a) oder alternativ zusätzlich im Mixer zerschlagen (b) . Die anschließende Trennung der Membranen auf einem linearen Gradienten 6 Std. bei 27 000 rpm zeigt Abbildung 5. Im Fall (a) ist im Gradienten am Radioaktivitätsmaximum bei 50 % Saccharose noch ein Katalasegehalt von insgesamt 35 U meßbar, während bei (b) keine partikuläre Katalase mehr feststellbar ist.

SDS - PAGE der gereinigten Membranen siehe Abb. 4

... Saccharose (%); *** Radioaktivität

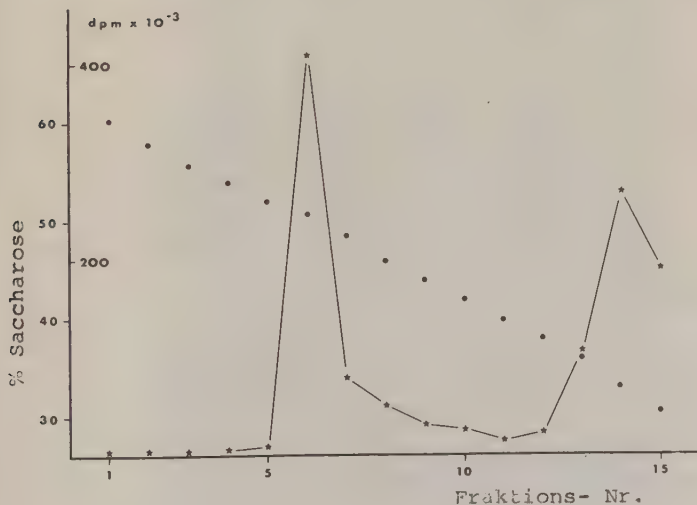


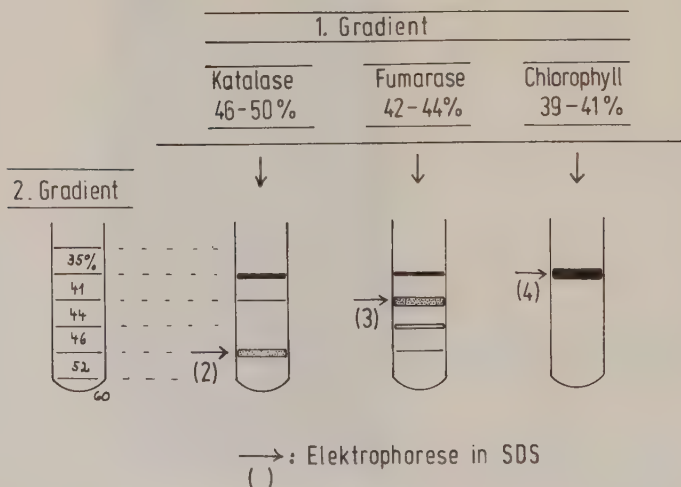
Abb. 5 : Reinigung radioaktiv markierter Peroxisomenmembranen über linearen Gleichgewichtsgradienten

Abbildung 6 (folgende Seite) gibt die Reinigung isolierter Membranen über einen Stufengradienten wieder.

Peroxisomenmembranen, durch 1 : 1 Verdünnung von Gradientenfraktionen des Katalasemaximums und Zentrifugation bei 100 000 x g gewonnen (1), werden auf einen Stufengradienten (60, 52, 46, 44, 41, 35 % Saccharose) im SW 27 - Rotor 5 Std. zentrifugiert. Membranen, die sich an der 46 % - 52 % - Grenze einstellen (2), werden in der SDS - PAGE untersucht.

Zum Vergleich: Material aus dem Mitochondrien - und Thylakoid - Maximum, das sich im Stufengradienten bei der wiederum gleichen Dichte wie im 1. Gradienten zwischen 41 % - 44 % (3) und zwischen 35 % - 41 % (4) einstellt.

Im folgenden ist die Bandenverteilung im Stufengradienten schematisch wiedergegeben:



Schema 2 : Reinigung isolierter Membranen über Stufen-
gradienten

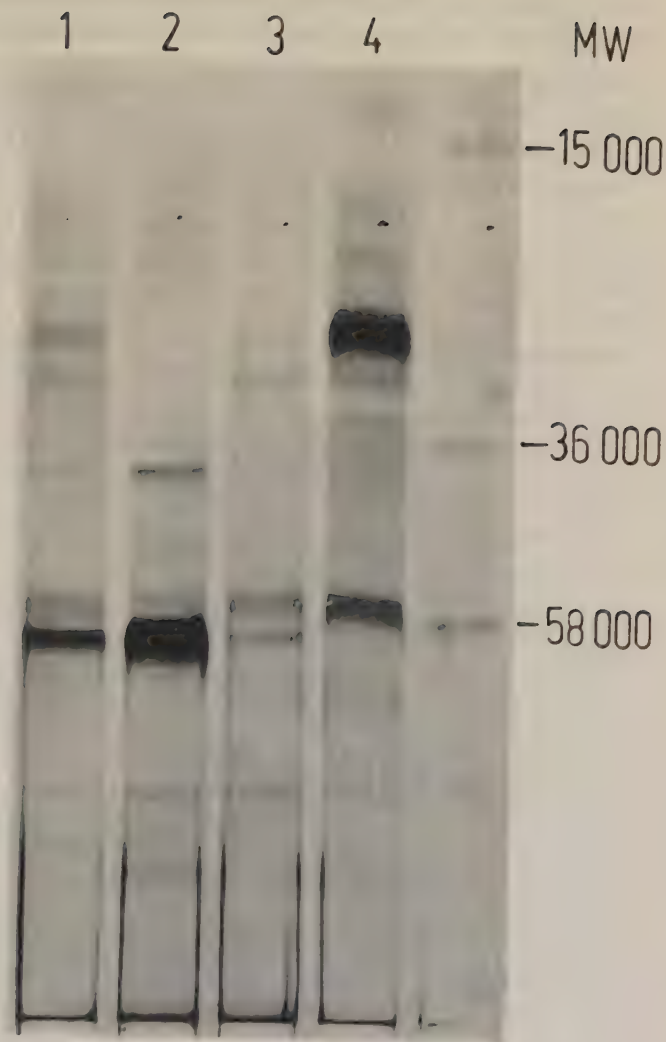


Abb. 6 : Reinigung isolierter Membranen über Stufengradienten, SDS - Elektrophorese; Einzelheiten S. 36

Membranen aus verschiedenen Fraktionen im Bereich des Katalasemaximums des Zonenrotorgradienten zeigen eine Verschiebung der Intensitäten der einzelnen Banden.

Fraktionen zwischen 46 % und 50 % Saccharose werden geschockt, zentrifugiert, in SDS aufgenommen und elektrophoretisiert:

- 1 Membranproteine bei 46 % Saccharose,
- 2 47 %
- 3 48 %
- 4 49 %
- 5 50 %
- M Markerproteine

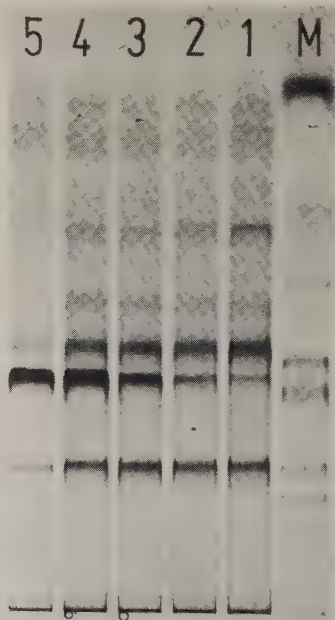


Abb. 7 : Intensitätsverschiebung der Proteinbanden von Membranen zwischen 46 % und 50 % Saccharose

Tabelle 2 und Abbildungen 8 a und b (folgende Seiten) zeigen die Korrelation der Leitenzyme im Gradienten mit dem Proteinmuster entsprechender Membranen. Repräsentative Fraktionen des Gradienten werden nach osmotischem Schock und Zentrifugation in SDS aufgenommen und elektrophoretisiert. Die Nummerierung in Abb. 8 a und b ist analog der in Tab. 2 . M = Markerproteine

A₆₆₀ nach 1 : 2 Verdünnen mit Wasser

Frkt.Nr	Sacch.%	Katalase U/ml	Fumarase mU/ml	A ₆₆₀	Membranprot. mg/ml
1	35.0	0	6	<0.03	0.3
2	39.5	4	13	0.9	6.6
3	41.5	6	27	1.8	11.0
4	43.5	65	30	0.9	2.4
5	44.5	82	36	0.4	1.8
6	46.0	120	23	0.1	0.9
7	47.0	205	12	0.07	0.55
8	48.0	230	6		0.25
9	49.0	250	<2		0.25
10	50.0	260	<2		0.22
11	51.5	150	<2		0.18
12	53.0	48			0.16

Tab. 2 : Leitenzyme und charakteristische Daten ausgewählter Fraktionen eines Gradienten

Membranen aus dem Bereich des Katalasemaximums zeigen keinerlei Malatsynthase - Aktivität (vgl. S. 69).

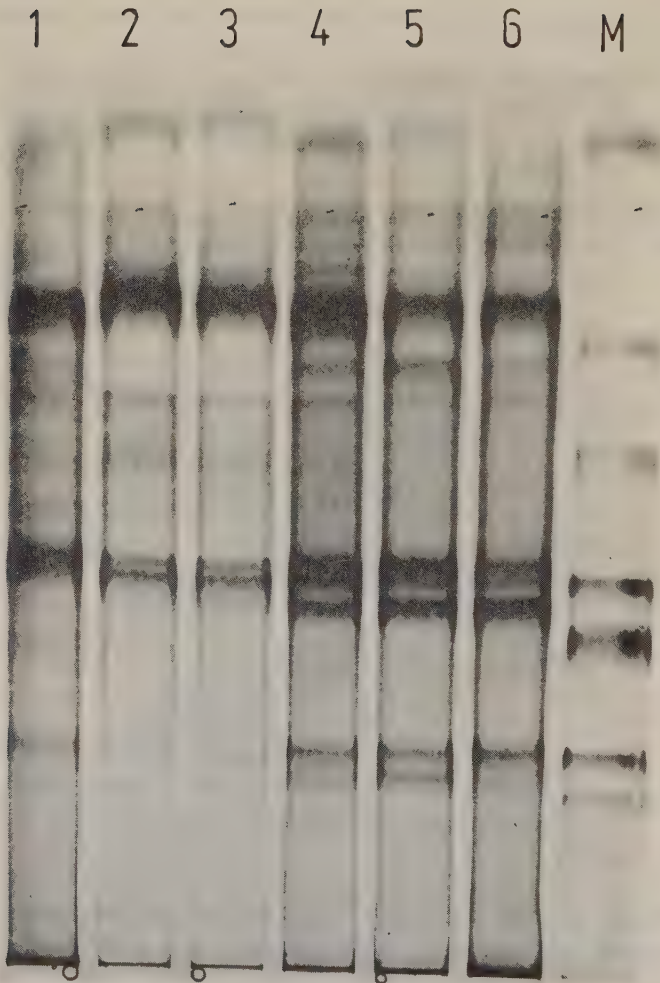


Abb. 8 a : Membranproteinmuster in SDS der in Tab. 2
aufgeführten Gradientenfaktionen 1 - 6;
M = Markerproteine

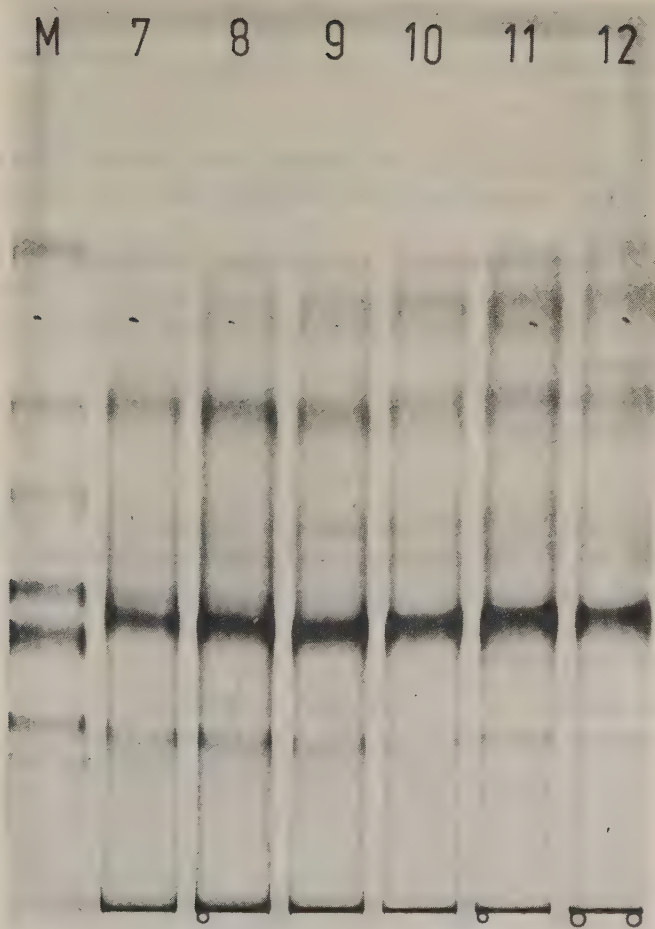


Abb. 8 b : Membranproteinmuster in SDS der in Tab. 2
aufgeführten Gradientenfraktionen 7 - 12;
M = Markerproteine

Das endoplasmatische Retikulum wird über separate Gradienten gereinigt. Als Ausgangsmaterial zu seiner Isolierung dient entweder der 100 000 x g - Niederschlag der Differentialzentrifugation (Mikrosomen) (A) oder der 13 000 x g - Überstand, aus dem durch Geschwindigkeitszentrifugation auf ein Polster eine mikrosomale Fraktion gewonnen wird (B), wie unter "Methoden" beschrieben.

Beide Membransuspensionen werden über lineare Gradienten weiter gereinigt; alle Lösungen sind 1 mM an EDTA.

Zentrifugationsdauer: (A) Gradient 20-40 %, 15 Std.

(B) 17-37 %, 2 Std.

Abb. 9 (folgende Seite) zeigt den Verlauf beider Gradienten. Proteingehalt ...

Leitenzymaktivität ***

Saccharosedichte (%): Abszisse

Die spezifischen Aktivitäten der Antimycin A - insensitive NADH - Cytochrom c - Reduktase bewegen sich für das ER zwischen 0.25 und 0.50 U / mg Protein. Zum Vergleich zeigen andere Zellorganellen bzw. Membranen folgende Aktivitäten:

Thylakoide < 0.5 mU / mg Protein

Peroxisom.Membran 5 mU / mg Protein (etwa 10 % Hemmung mit Antimycin A)

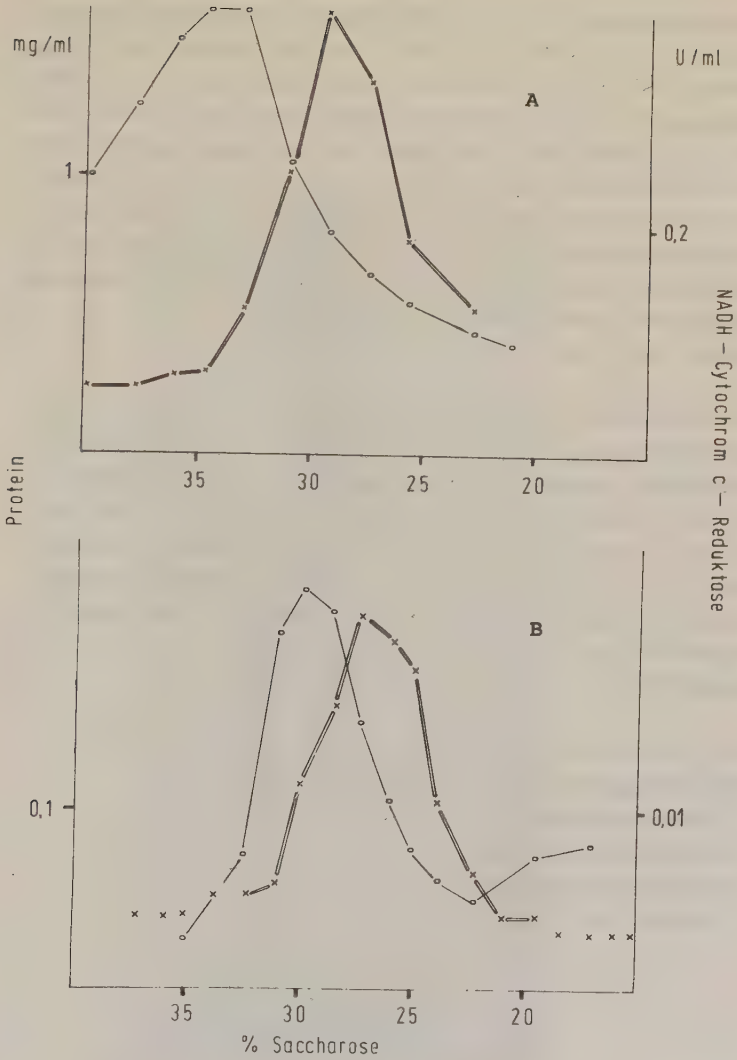


Abb. 9 : Gradiententrennung des ER; Legende S. 42

Die Auftrennung der Proteine der ER - Membran bereitet Schwierigkeiten, da ein erheblicher Anteil der Proteine nach SDS - Behandlung nicht in das PAG eindringt. Dieser Effekt, der in geringem Maße immer dann auftritt, wenn Membranen in SDS aufgelöst und elektrophoretisiert werden (vgl. Abb. 13), kann weder durch Variation der SDS- oder Harnstoffkonzentration im Extraktionsmedium noch durch Zugabe von Harnstoff ins Gel selbst, nicht durch längeres Erhitzen auf 100 °C ³⁹⁾ und nicht durch anschließende Zentrifugation bei 100 000 x g entscheidend beeinflusst werden. Auch bei vorherigem Entfernen des Lipids tritt keine Änderung ein.

Um die Störung durch dieses Protein, das vom Start her zum Verschmieren aller Banden führt, teilweise auszuschließen, werden die ER - Membranen nach Behandlung mit 0.2 M KCl (vgl. S.46) und nach 30 min Kochen in der SDS / Harnstoff - Lösung über eine geeichte Sepharose 4 B - Säule (5 ml) grob in 3 MW - Fraktionen aufgetrennt, die Fraktion der hochmolekularen Aggregate verworfen und die beiden übrigen (1 und 2) in SDS elektrophoretisiert.

Abb. 10 (folgende Seite):

Auftrennung der Proteine des ER in SDS

- 1 höhere trennbare MW
- 2 leichtere trennbare MW
- 3 unbehandelte Membranen
- 4 gereinigtes SP-63

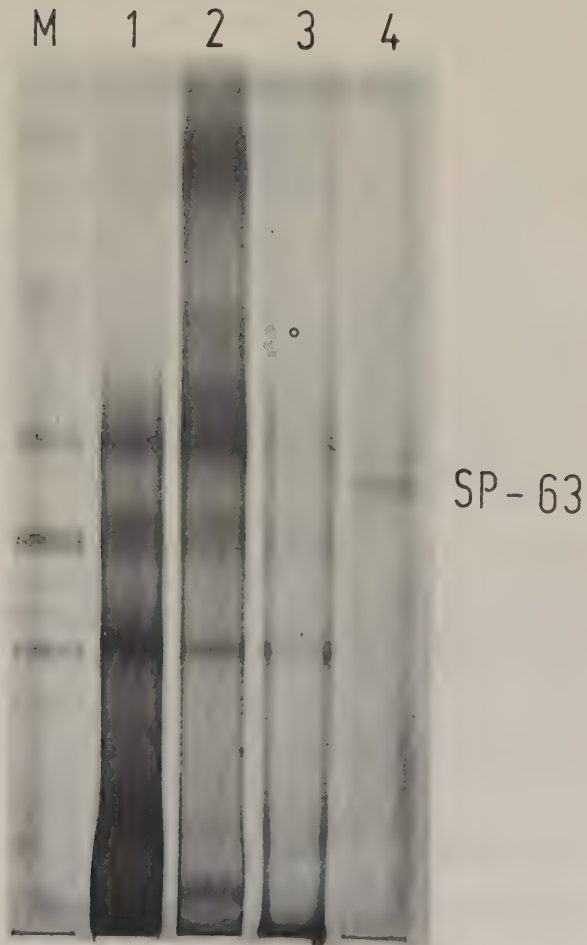


Abb. 10 : Auftrennung der Proteine des ER mit SDS;
Elektrophorese nach Gelfiltration, vgl. S.44
M : Markerproteine

2. Löslichkeitsverhalten der peroxisomalen Membran- proteine

Das Ergebnis der Ablöseversuche mit verschiedenen Agentien zeigen Abb. 11 a und b (folgende Seiten).

Peroxisomen - Membransuspensionen mit einem Proteingehalt von 100 µg werden bei 4° mit verschiedenen Agentien behandelt, bei 100 000 x g sedimentiert und "Überstand und Niederschlag quantitativ auf SDS - PAG elektrophoretisiert. Die Bahnen für "Überstand und Niederschlag sind somit direkt miteinander vergleichbar.

Darüberhinaus wird eine Solubilisierung weder mit Aceton, Butanol / Wasser oder Chloroform / Methanol / Wasser erreicht (ohne Abbildung). Proteinniederschläge nach Acetonfällung von Membranen verhalten sich gegenüber den untersuchten Agentien im Solubilisierungsversuch genauso wie intakte Membranen und zeigen auch in der anschließenden SDS - Elektrophorese kein verändertes Laufverhalten (vgl. ⁶⁵).

Die Fähigkeit einer 0.2 M KCl - oder 0.1 % Triton X - 100 - Lösung, kontaminierendes Protein herauszulösen, ohne das SP-63 zu solubilisieren, kann bei präparativen Reinigungen ausgenutzt werden.

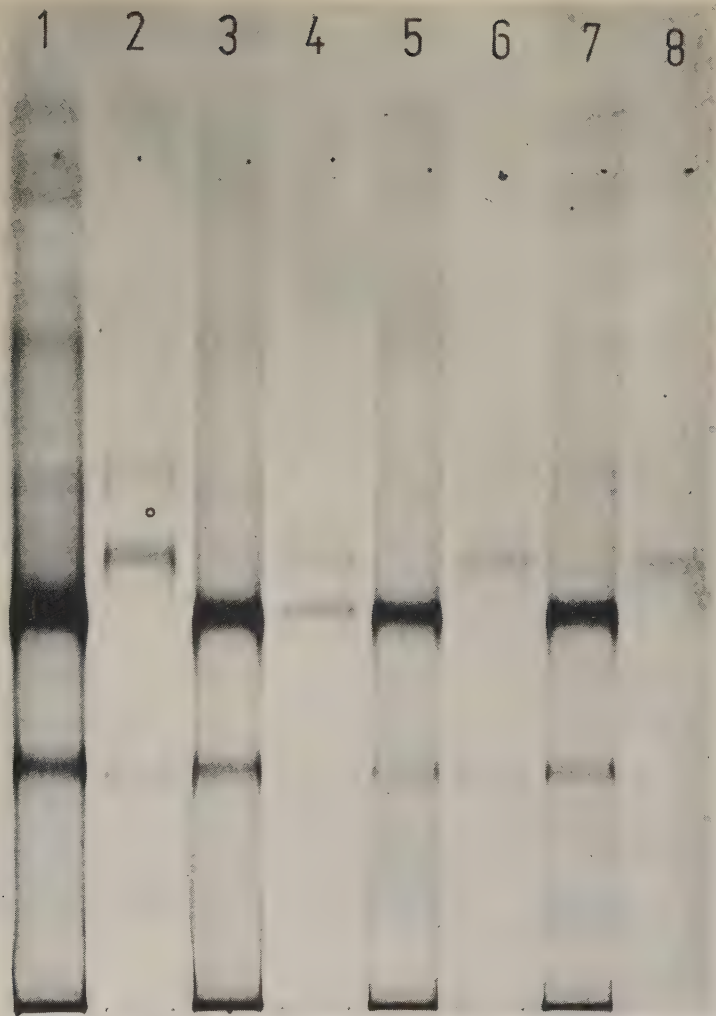


Abb. 11 a : Solubilisierung des SP-63; SDS-Elektrophorese

3	4:	"	1 M KCl
5	6:	"	0.1 % Triton
7	8:	"	0.1 % Cholat

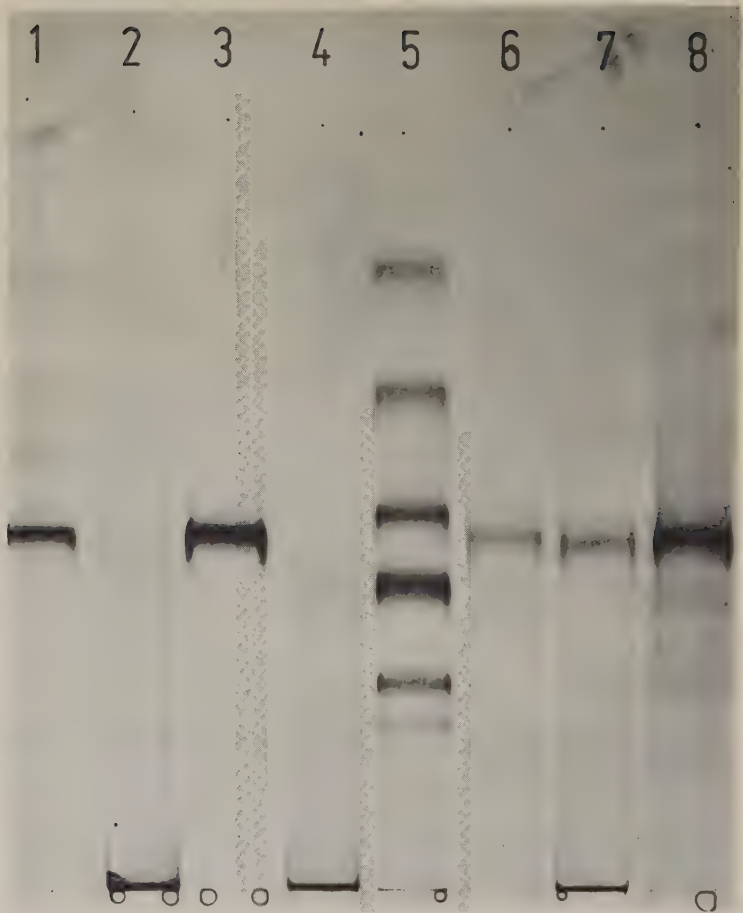


Abb. 11 b : Solubilisierung des SP-63; SDS-Elektrophorese
Bahn 1 und 2: Überstand und Niederschlag 8 M Harnstoff
3 4: " 6 M Guanidinium-Cl
5 : Molekulargewichtsmarker
6 7: Üu. Nd. 1 M KCl + 0.1 mg Cholat / mg Protein
8 : gereinigtes SP-63

3. Reinigung und weitere Charakterisierung des Hauptproteins (SP-63) der Peroxisomenmembran

Die Proteine der Peroxisomenmembran lassen sich durch Gelfiltration auf Sepharose 4 B in SDS auftrennen.

Gradientenfraktionen zwischen 49 % und 52 % Saccharosedichte mit einem Proteingehalt von 30 mg werden mit KCl behandelt (vgl. S. 46), in SDS mit Aceton gefällt und das Protein auf einer Säule von 400 ml Bettvolumen in SDS getrennt (vgl. "Methoden").

Abb. 12 (folgende Seite) zeigt das Elutionsprofil. Die Bezifferung über der Proteinkurve entspricht der Bezeichnung der Bahnen in Abb. 13. Fraktionen 6 und 7 zeigen eine grüne Färbung.

Abb. 13 gibt das elektrophoretische Bild der Proteintrennung in SDS (Abb. 12) wieder. Die einem Proteingehalt von 100 µg entsprechenden Volumina der Säuleneluate werden ankonzentriert und elektrophoretisiert.

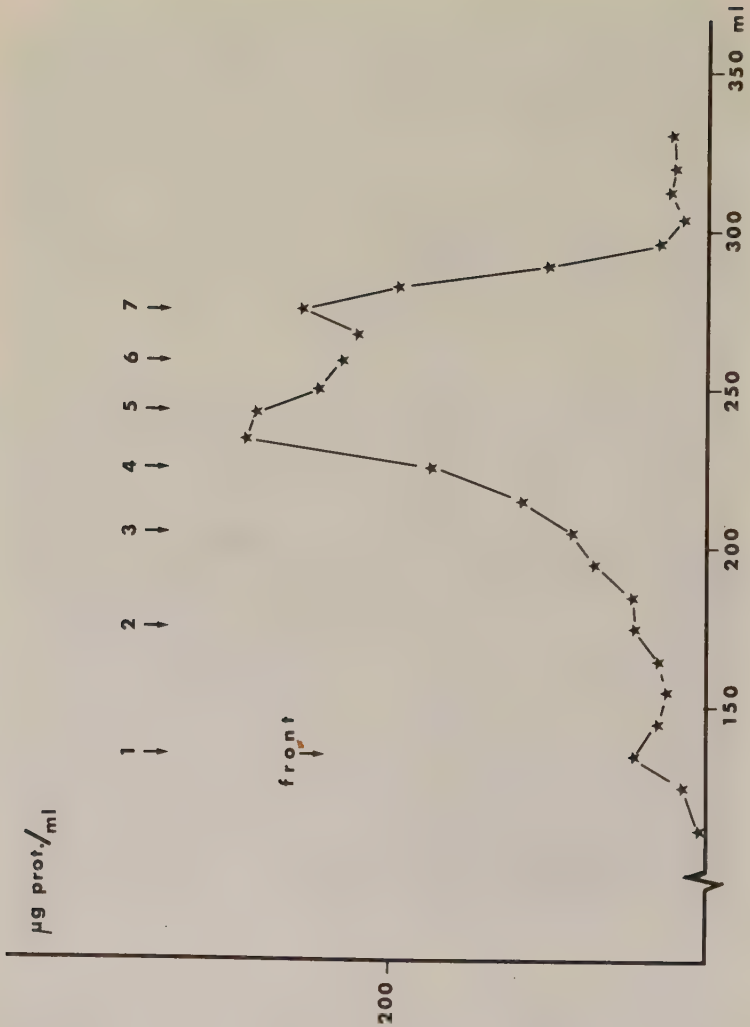


Abb. 12 : Trennung peroxisomaler Membranproteine auf Sepharose 4 B in SDS ; Bromphenolblau bei Elutionsvol. 360 ml

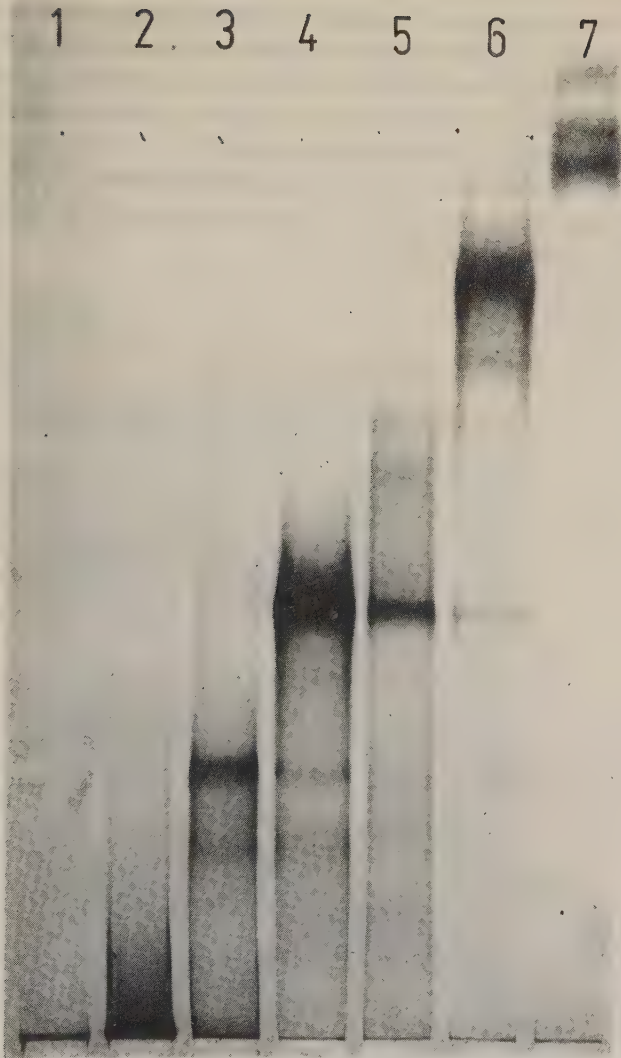


Abb. 13 : Proteinzusammensetzung von Säuleneluat nach
Auftrennung von peroxisomalen Membranproteinen;
Elektrophorese in SDS

Durch eine zweite Gelfiltration gelingt es, das SP-63 in elektrophoretisch reiner Form zu erhalten: Abb. 14, Bahn (2); (3) das Fluoreszenzderivat, dessen Lage vor dem Anfärben unter der UV - Lampe bei 350 nm mit Tusche markiert wird. (1) zum Vergleich die ungereinigten Membranproteine. M = Markerproteine

Die Bande des SP-63 zeigt keine Veränderung, wenn bei der Probenvorbereitung das Mercaptoäthanol weggelassen wird (ohne Abbildung).

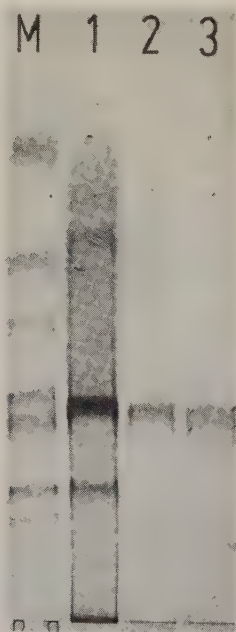


Abb. 14 : SDS - Elektrophorese des gereinigten SP-63 und seines Fluoreszenzderivats

Ebenso kann eine Reinigung über präparative PAG - Elektrophorese in SDS erreicht werden. Sie böte sich an, um unter Umgehung des Saccharose - Dichtegradientenlaufs aus einem 15 000 x g - Niederschlag(nach Gelfiltration zur groben Vortrennung nach Molekulargewicht)direkt eine gereinigte SP-63 - Fraktion zu erhalten, da das Protein in keiner anderen Organellenmembran enthalten ist (vgl. S.66).

Das Ergebnis einer solchen Gelfiltration eines 15 000 x g Niederschlages zeigt Abb. 15. Das Eluat ist analog zu Abb. 12 fraktioniert.

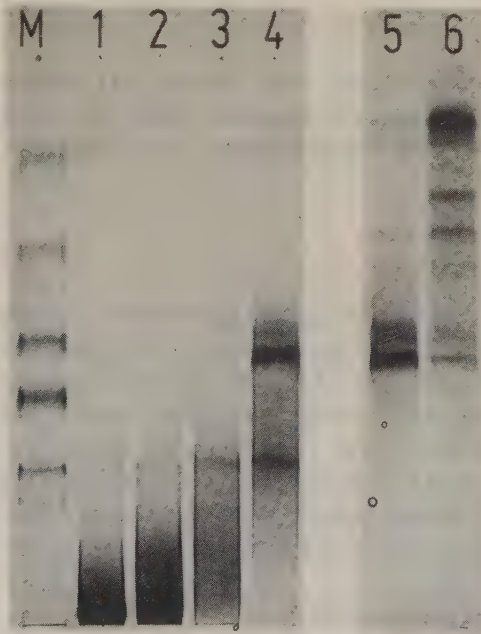


Abb. 15 : SDS - Elektrophorese von Säuleneluaten(1 - 6) zur Auftrennung der Proteine eines 15 000 x g Differentialzentrifugationsniederschlags;
M = Markerproteine

Aus dem Protein der Bahn 4 und 5, Abb. 15, läßt sich elektrophoretisch reines SP-63 durch präparative Elektrophorese isolieren; allerdings treten dabei Schwierigkeiten auf:

- Der präparative Lauf trennt nahe beieinanderliegende Banden weniger scharf auf als der analytische.
- Die genaue Lokalisierung der betreffenden Bande, die das Protein enthält und anhand der vorher bestimmten relativen Mobilität aus dem Gelstück direkt nach dem Lauf herausgeschnitten wird, ist bei nahe benachbarten Banden schwierig; man kann dies z.T. dadurch umgehen, daß ein Anteil (ca 1/10) des Proteingemisches fluoreszenzmarkiert wird.
- Das Elutionsverhalten des Proteins ist schlecht; so werden bei der Diffusionsmethode (vgl. S. 17) nur etwa 10 - 30 % aus dem Polyacrylamid herausgelöst.

Versuche mit SDS - freien Polyacrylamid - Gelsystemen zur Abtrennung des SP-63 oder zur Anwendung als weiteres Reinheitskriterium für das Protein sind ohne Erfolg. Weder der Lauf in 8 M Harnstoff noch der in 8 M Harnstoff mit 1 % Triton X - 100⁴⁸⁾ führt zu definierten Banden im Gel; das Protein dringt nicht in das Gel ein. (Rinder-serumalbumin und Hämoglobin als Vergleichsproteine liefern in beiden Systemen definierte Banden.)

Das "diskontinuierliche" SDS - System (vgl. S. 18), bei dem sich während des Laufs ein p_H - Gradient einstellt, bestätigt das MW des SP-63; auch in diesem System ist für das gereinigte Protein nur 1 Bande feststellbar. Der Test auf Glykoproteine ist negativ.

Das gereinigte Protein hat im UV in SDS - Puffer ein Absorptionsmaximum bei 270 nm (Cary) (Abb. 16); folgende Extinktionen werden bei einer Proteinkonzentration von 0.4 mg / ml gemessen (Zeiss):

$$E_{280} = 0.74$$

$$E_{270} = 0.78$$

$$E_{260} = 0.735$$

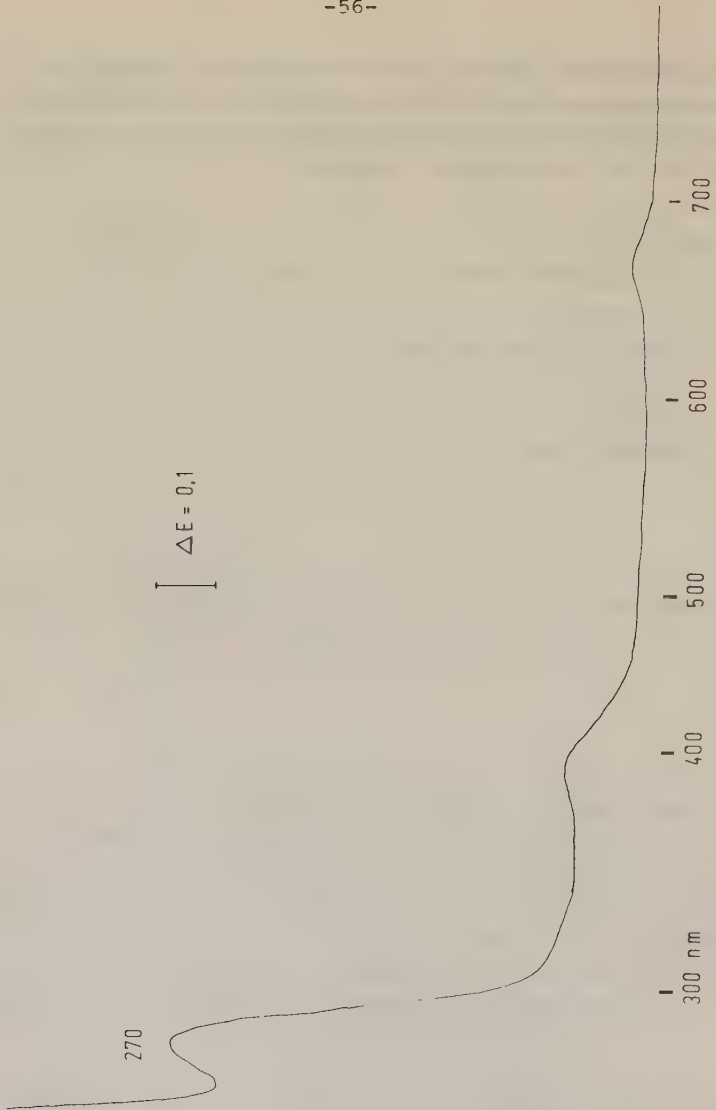


Abb. 16 : UV / VIS - Spektrum des gereinigten SP-63 in SDS (0.4 mg Protein / ml)

Zur kovalenten radioaktiven Markierung des SP-63 (Abbildung 17) werden 200 μg gereinigten Proteins in 100 μl SDS - Puffer mit der diazotierten ^{35}S - Sulfanilsäure umgesetzt (siehe "Methoden") und 10 μl auf das SDS - Gel aufgetragen. Nach dem Anfärben werden die Bahnen halbiert und eine Hälfte naßchemisch oxidiert ***, die andere mit SDS eluiert Darunter schematisch die Lage der angefärbten Bande (Abb. 17).

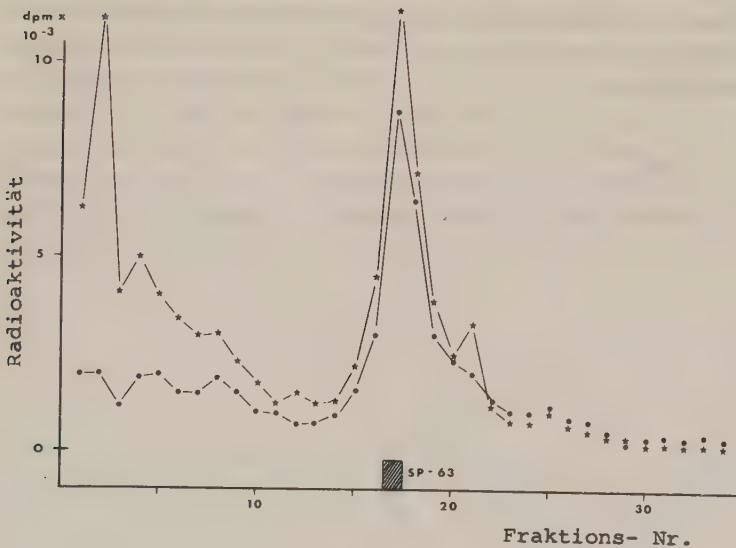


Abb. 17 : Markierung des SP-63 mit diazotierter ^{35}S - Sulfanilsäure; Radioaktivitätsverteilung nach SDS - Elektrophorese (siehe oben)

Das radioaktiv markierte SP-63 (20 µg) wird zusammen mit 2 fluoreszenzmarkierten Protein - Molekulargewichtsmarkern (Alkoholdehydrogenase aus Hefe, MW der Untereinheiten 17 000 und 8 - Galaktosidase aus E.coli, 170 000 je 2 µg) in SDS auf einen Saccharosegradienten in SDS 0,5 Std. bei 40 000 rpm zentrifugiert: Abb. 18.

1: Position der Protein- und Fluoreszenzmaxima
2: Radioaktivitätsmaximum

Saccharose ***

Radioaktivität ***

Das SP-63 wandert im Gradienten zwischen den beiden Markern und liegt somit bei dieser Trennung im gleichen molaren Zustand vor wie bei der SDS - Elektrophorese. Das Verfahren bestätigt grob den auf SDS - PAG ermittelten MW - Wert.

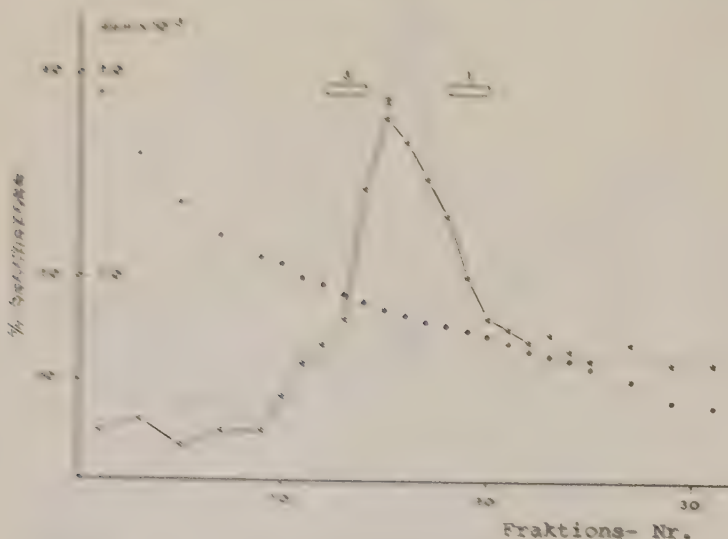


Abb. 18: Dichtegradientenzentrifugation des radioaktiv markierten SP-63 im SDS - Gradienten, siehe oben

Die isoelektrische Fokussierung in 8 M Harnstoff und 1 % Triton X - 100 stellt eine Kombination zweier Techniken ^{50,66)} dar. In diesem System lassen sich Proteine auch dann noch fokussieren, wenn, wie etwa nach einer Dialyse, restliches SDS noch am Protein gebunden ist.

Während in der Harnstoff / Triton - Elektrophorese (S. 94), das SP-63 nicht ins Gel eindringt, gelingt dies hier in der Fokussierung bei gleichen Harnstoff / Triton - Konzentrationen.

Gereinigtes und durch Dialyse weitgehend von SDS befreites SP-63 stellt sich im p_H - Gradienten zwischen p_H 6.8 und 8.2 ein. Allerdings erbringt die Fokussierung mehrere diffuse Banden. Es läßt sich bis jetzt noch keine Aussage machen, ob dies tatsächlich auf eine Heterogenität im isoelektrischen Punkt des Proteins zurückzuführen ist oder auf einen methodischen Artefakt, der durch Veränderung der Parameter (Fokussierungsdauer, veränderte Detergenz - Zusammensetzung, Gelzusammensetzung u.a.) auszuschalten wäre.

Aminosäuren - Zusammensetzung : 2 verschiedenartig gewonnene Proben des SP-63 werden auf ihre Aminosäuren - Zusammensetzung untersucht:

- a) SP-63 aus gradientengereinigten Peroxisomenmembranen, durch wiederholte SDS - Gelfiltration gereinigt;
- b) SP-63 aus den Membranen des 15 000 x g - Niederschlags der Differentialzentrifugation gereinigt und partiell fluoreszenzmarkiert, wie auf S. 23 beschrieben.

Die folgende Tabelle gibt die Molprocente der einzelnen Aminosäuren (1) und eine Berechnung der Absolutzusammensetzung, Mole Aminosäure / Untereinheit des Proteins (2), für ein MW von 63 000 wieder. Polare Aminosäuren haben einen Anteil von 48 % .

	1		2
	a	b	a
Asp	10.9	12.1	63.8
Thr	5.6	5.5	32.8
Ser	8.0	8.6	46.8
Glu	9.8	10.7	57.1
Pro	5.1	4.0	29.9
Gly	9.5	10.4	55.3
Ala	9.1	8.5	53.1
Cys	Spuren		-
Val	5.8	5.3	34.2
Met	Spuren		-
Ile	4.6	4.6	27.2
Leu	9.5	8.9	55.4
Tyr	2.9	3.2	16.7
Phe	4.9	4.9	28.5
His	2.0	1.2	11.5
Lys	7.3	7.5	42.7
Arg	4.7	4.2	27.4
Trp	0.3	nicht best.	2.04
	100 %	99.6 %	MW 63 000

Tab. 3

IV. Diskussion

1. Proteinzusammensetzung der Peroxisomenmembran

Die Proteinzusammensetzung der Peroxisomenmembran von Laubblättern von Lens culinaris wird untersucht und ihr Hauptprotein (SP-63) gereinigt.

Peroxisomen lassen sich in hoher Reinheit auf Saccarosegradienten abtrennen, bei denen der Hauptteil der Membranen des Rohorganellenniederschlages, die Thylakoide, zu geringeren Saccharosedichten flotieren, während die Peroxisomen in entgegengesetzter Richtung zu höheren Dichten wandern; ihre Gleichgewichtsdichte liegt in diesem Anzuchtstadium bei 1.235 g/cm^3 , während sie bei jüngeren Pflanzen geringer ist ²⁴⁾ .

Wird die Peroxisomenfraktion aus dem Gradienten 1 : 1 mit Wasser verdünnt, werden die Organellen osmotisch geschockt und setzen 99 % ihrer Katalase frei; sie ist die Hauptkomponente der löslichen Matrixenzyme (Abb. 4 ; vgl. auch ⁶⁸⁾).

Die sedimentierbaren Membranen können bei schonender Aufarbeitung noch geringe Mengen Katalase enthalten, die möglicherweise noch auf wenige intakte Organellen zurückzuführen ist; sie sind aber völlig frei von Katalase, wenn sie zusätzlich kurz mit einem Mixer zerschlagen werden. Somit verhalten sie sich anders als Glyoxysomen aus Rizinus, bei denen Katalase zu 10 % an der Membran gebunden bleibt ⁶⁹⁾ , oder auch als Mikrokörper aus Dunaliella marina ⁷⁰⁾ .

Die Peroxisomenmembranen lassen sich über lineare oder Stufengradienten (Abb. 5 und 6) weiter reinigen; sie stellen sich auf den Gradienten bei der annähernd gleichen Dichte von 1.23 g/cm^3 entsprechend 50 % Saccharose

(w/w) wie die intakten Peroxisomen ein.

Dieser Befund ist überraschend, da für Rizinus Glyoxysomen ⁶⁹⁾ eine Abnahme der Gleichgewichtsdichte von 53 % für intakte Organellen auf 43 % für Membranen beobachtet wird; er deutet zum einen auf ein hohes Protein : Lipid - Verhältnis in der Peroxisomenmembran hin, zum anderen muß daraus geschlossen werden, daß die Matrix der Peroxisomen keinen Einfluß auf die Gleichgewichtsdichte der intakten Organelle hat.

Die Hauptprotein Komponente der Peroxisomenmembran stellt ein Protein dar, dessen Untereinheitenmolekulargewicht auf SDS - Polyacrylamid - Gelen bei einer Acrylamidkonzentration von 5 % unter Standardbedingungen zu 63 000 bestimmt wird; als ein solches Monomer liegt es auch bei Geschwindigkeitszentrifugationen in SDS - haltigen Saccharosegradienten vor (Abb. 18). Proteinbanden mit Molekulargewichten bei 100 000 und zwischen 15 000 und 30 000 sind, besonders bei gereinigten Membranen (Abb.4), als anteilmäßig deutlich untergeordnet zu bezeichnen.

Der prozentuale Anteil des Proteins vom Molekulargewicht 63 000 (SP-63) an dem Protein der Peroxisomenmembran liegt sehr hoch, ist aber schwer exakt zu quantifizieren, zumal auch ein geringer Proteinanteil trotz entsprechender Behandlung (vgl. S. 44) bei der SDS - Elektrophorese von SDS - gelösten Membranen nicht in das Gel eindringt. Bei Gelfiltration in SDS (Abb. 12 und 13, Bahnen 1 und 2) eluiert diese Fraktion im oder kurz nach dem Ausschlußvolumen der Säule und verhält sich somit wie ein extrem hochmolekulares Aggregat. Eine Abschätzung der Mengenverhältnisse, basierend auf den Werten aus Abb. 12 und 13, ergibt, daß der Anteil der mit SDS nicht erfaßbaren Proteine unter 10 % des Gesamtproteingehalts der Peroxisomenmembran liegt. Von den in der Elektrophorese in

das Gel eindringenden Proteinen repräsentiert das SP-63 je nach Reinheit der Membranpräparation etwa 50 - 70 % .

Das Proteinmuster der löslichen Matrixenzyme (Abb. 4) zeigt keine Banden, die auch im Muster der geschockten Membranen vertreten wären; d.h. die Matrixenzyme werden durch den osmotischen Schock quantitativ freigesetzt und sind nicht, wie für Glyoxysomen bekannt ⁶⁹⁾ , zu einem gewissen Grad an die Membran assoziiert.

Die Solubilisierungsexperimente (Abb. 11a und 11b) zeigen, daß das Hauptprotein der Peroxisomenmembran fest mit der Membran verbunden ist ("intrinsic protein" ⁷¹⁾) und möglicherweise als Strukturprotein (SP) oder "ghost protein" ³⁵⁾ anzusprechen ist, da ihm bis jetzt keine enzymatische Aktivität zuzuordnen war (vgl. S. 69).

Organische Lösungsmittel sind nicht in der Lage, das Sp-63 zu solubilisieren, wie dies für bestimmte mikrosomale und mitochondriale Enzyme beschrieben ist ⁷²⁾ ; ebensowenig gelingt dies mit 0.1 % Triton X - 100, 0.1 % Cholat oder 0.2 M KCl, d.h. Agentien, die membran-assoziierte Proteine / Enzyme ablösen sollten ⁷³⁾ . Eine geringe Ablösung (< 10 %) kann erst mit 1 M KCl, besser noch in Verbindung mit 0.1 mg Cholat / mg Protein ⁷⁴⁾ , erreicht werden; eine völlige Solubilisierung bringen erst stark denaturierend wirkende, die Membran desintegrierende Agentien wie 8 M Harnstoff, 6 M Guanidiniumchlorid oder SDS.

Möglicherweise besteht in Harnstoff - Lösungen eine Tendenz zur Aggregation: 1. Harnstoff - Elektrophoresen (ohne SDS) mit Harnstoff - Membranextrakten (vgl. S. 26) führen zu keinen definierten Banden, die Hauptmenge des Proteins, obwohl nach Sedimentationskriterien löslich, dringt nicht in das Gel ein; 2. der Versuch, das SDS

aus gereinigten SP-63 - Lösungen quantitativ mit Ionen-austauschern zu entfernen ⁴⁹⁾, führt nicht zu einer Elution des Proteins vom Austauscher.

Gleiches Löslichkeitsverhalten zeigt sich, wenn Membranproteine zuerst mit Aceton oder Chloroform / Methanol von Lipid befreit werden und danach mit Salz oder / und Detergenz behandelt werden. Wiederum sind nur stark denaturierende Agentien in der Lage, das SP-63 zu lösen.

Die Literatur über die Proteinzusammensetzung von Mikrokörpermembranen anderer Herkunft ist kontrovers. Glyoxysomenmembranen z.B. aus Rizinus (Ruis ³⁶⁾), erhalten nach osmotischem Schock und Gradientenzentrifugation, zeigen in der SDS - Elektrophorese noch über 10 Banden; dies ist plausibel, da für die Glyoxysomenmembran im Gegensatz zu der peroxisomalen Membran mehrere Enzyme bzw. Enzymsysteme als membranassoziiert oder membran-gebunden bekannt sind. Das Hauptprotein der glyoxyso-malen Membran wird von den Autoren mit einem Molekulargewicht von 66 000 angegeben und zeigt ähnliche Solubilisierungseigenschaften wie das peroxisomale SP-63.

Allerdings kompliziert sich das Bild bei Glyoxysomen insofern, als das Molekulargewicht von Malatsynthase bei Gurken zu 62 000 bestimmt wurde ⁷⁵⁾ und dieses Enzym als membranassoziiert bekannt ist ⁶⁹⁾ und selbst mit 1 M KCl nicht völlig abgelöst werden kann ³⁵⁾, so daß bei Glyoxysomen zumindest eine Überlagerung des integralen Membranproteins bei 66 000 mit membranassoziiertem Enzymprotein in Betracht gezogen werden muß.

Zu abweichenden und in sich widersprüchlichen Ergebnissen kommen Lord und Mitarbeiter, die das Molekular-

gewicht der Hauptbande in SDS - PAGE von Rizinus - Glyoxysomenmembranen einmal zu 78 000 ³⁵⁾, in späteren Arbeiten aber zu 55 000 ³⁷⁾ angeben. Die Hauptbande wird mit 1 M KCl weitgehend entfernt, lediglich eine Bande bei 28 000 wird als echtes Membranprotein bezeichnet. Cholat - Behandlung der Membran (0.5 % Cholat) läßt die Intensität der Hauptbande weitgehend unverändert, löst aber nahezu alle anderen Proteine heraus. (Zugleich soll auch das endoplasmatische Retikulum ein mit der Glyoxysomenmembran identisches Proteinmuster und gleiches Detergenzverhalten zeigen; vgl. dazu S. 72)

Die einzigen Untersuchungen, die bislang zur Auftrennung peroxisomaler Membranproteine in SDS vorliegen, sind ebenfalls von Lord und Mitarbeitern in der genannten Arbeit ³⁵⁾ an Kürbis durchgeführt; sie zeigen für die mit 0.15 M KCl gewaschenen Membranen mehr als 10 (!) Proteinbanden, die sich von dem Proteinmuster der Glyoxysomen nur in der Intensität einzelner Banden unterscheiden. Eine derartige Übereinstimmung erscheint allerdings im Lichte der bisherigen Erkenntnisse über Glyoxysomen und Peroxisomen, ihre unterschiedliche Spezialisierung im Stoffwechsel, wenig plausibel.

Die Hauptbande wird mit einem Molekulargewicht von 75 000 angegeben, jedoch muß der Wert wegen des oben Gesagten und weiterer Unstimmigkeiten in der Molekulargewichtsangabe für bestimmte lösliche Enzyme angezweifelt werden. Darüberhinaus liefert die Veröffentlichung in bezug auf die peroxisomale Membran und das Hauptprotein keinerlei Daten, so daß ein weiterer Vergleich mit den hier erzielten Ergebnissen nicht möglich ist.

Zur weiteren Charakterisierung des Hauptproteins der

Peroxisomenmembran aus Lens culinaris wird eine Reinigung angeschlossen; sie gelingt entweder durch wiederholte Gelfiltration auf Sepharose 4 B in SDS, wobei Proteine wegen ihrer Komplexbildung mit dem Detergenz weit höhere apparente Molekulargewichte zeigen als in Abwesenheit des Detergenz; die Reinigung kann auch elektrophoretisch über SDS - PAG durchgeführt werden.

Da als Methode zur Verfolgung und Überprüfung der Reinigung zunächst nur die analytische Elektrophorese zur Verfügung steht, stellt die Markierung des Proteins zu leichter erkennbaren Derivaten ein wertvolles Hilfsmittel dar. Beide verwendeten Methoden, Fluoreszenz - und Radioaktivitätsmarkierung mit ^{35}S - Sulfanilsäure, ändern das chromatographische Verhalten des Proteins in SDS nicht, sind aber darüberhinaus für Trennungen, wie z.B. isoelektrische Fokussierung, ungeeignet, bei denen die Eigenladung des Proteins eine Rolle spielt und nicht mehr durch die hohe negative Ladung des Detergenz maskiert wird.

An dem gereinigten Protein wird seine Aminosäuren - Zusammensetzung untersucht. Es zeigt sich, daß zwei unterschiedlich gewonnene Proben im Rahmen der Meßfehler identische Werte für die einzelnen Aminosäuren ergeben (Tab. 3): während Probe 1 durch Gelfiltration der Proteine gradientengereinigter peroxisomaler Membranen erhalten wird, entstammt Probe 2 dem Proteingemisch des 15 000 x g - Differentialzentrifugations - Niederschlages, das nach einer Säulenvortrennung und anschließender Fluoreszenzmarkierung mit 1/10 des Gesamtmaterials (vgl. methodischer Teil) über ein präparatives SDS-Gel gereinigt wird. Somit ist erneut sichergestellt, daß kein anderes Protein als das peroxisomale SP-63 die Bande bei 63 000 im 15 000 x g - Niederschlag aus-

macht (vgl. Abb. 2).

Auffallend ist der Mangel an schwefelhaltigen Aminosäuren (praktisch kein Methionin und Cystein / Cystin); damit übereinstimmend zeigt das Protein auch keine Beeinflussung durch reduzierende Agentien bei dem elektrophoretischen Lauf in SDS.

Der geringe Anteil an Tyrosin und besonders Tryptophan (nimmt man 2 Moleküle Tryptophan pro Untereinheit an, ergibt sich ein Molekulargewicht von etwa 62 000) dürfte sich auch auf das Absorptionsmaximum im UV auswirken (vgl. Abb. 16).

Das SP-63 hat keinen erhöhten Anteil an hydrophoben Aminosäuren, sondern eher einen hohen Prozentsatz an polaren Resten. Die üblicherweise verwendete Vergleichsgröße ⁶⁷⁾, die die Summe der Molprozent - Anteile von Lys, His, Arg, Asp, Thr, Ser und Glu darstellt, ergibt für das SP-63 48 % . Dieser Wert liegt in einem Bereich, der für lösliche Proteine typisch ist und nicht mit der festen Bindung des Proteins an die Membran zu korrelieren wäre. Allerdings gibt es Parallelen zu diesem Befund für bestimmte Membranenzyme ⁷⁶⁾ . Mögliche Erklärungen liegen in einer besonderen Faltung des Proteins, so daß hydrophobe Gruppen außen zu liegen kommen, oder in einer inhomogenen Verteilung hydrophober und hydrophiler Aminosäuren, die zur Bildung hydrophober Zentren und somit fester An- oder Einlagerung in die Membran führen. Eine Bestätigung dieser Annahme könnte eine tryptische Verdauung und Analyse der Bruchstücke erbringen.

Die Aminosäuren - Zusammensetzung des SP-63 zeigt eine auffallende Ähnlichkeit mit einer Gruppe von Proteinen aus Thylakoiden von Mais ⁷⁷⁾ , die trotz ihrer Hetero-

genität im Molekulargewicht zwischen 10 000 und 50 000 aus identischen Gruppierungen von einer Basisgröße von 10 000 bestehen und von den Autoren als kovalenter Baustein für die Proteine in den Thylakoidmembranen angesehen werden. Zum Vergleich ist die Aminosäuren - Zusammensetzung dieser Proteine (Mittelwert; siehe ⁷⁷⁾) der des SP-63 gegenübergestellt:

	Thylakoid-Proteine MW 10-50 000 ⁷⁷⁾	SP-63
Asp	9.2	10.9
Thr	5.0	5.6
Ser	5.7	8.0
Glu	9.3	9.8
Pro	5.3	5.1
Gly	12.0	9.5
Ala	9.3	9.1
Cys	Spuren	Spuren
Val	6.9	5.8
Met	1.9	Spuren
Ile	5.2	4.6
Leu	10.4	9.5
Tyr	3.3	2.9
Phe	5.7	4.9
His	1.0	2.0
Lys	5.2	7.3
Arg	4.2	4.7
Trp	gering	0.3

Tab. 4 : Vergleich der Aminosäuren - Zusammensetzung von Thylakoid - Proteinen mit der des peroxisomalen SP-63 ; Angaben in Molprozenten

Der isoelektrische Punkt des SP-63 liegt möglicherweise im Bereich um p_H 7 - 8; allerdings ist dies nur eine vorläufige Aussage, die, ebenso wie das Auftreten benachbarter Banden im Gel, erst durch die weitere Variation experimenteller Parameter der Fokussierung (vgl.S.59) bestätigt werden muß. Eine solche eindeutige weitere Charakterisierung neben der Auftrennung nach Molekulargewicht in der SDS - PAGE ist wegen des extremen Löslichkeitsverhaltens dieses Proteins schwierig (siehe auch die Versuche mit den Harnstoff - Elektrophoresen), ist aber unbedingt anzustreben.

Die Funktion des hier untersuchten und gereinigten Proteins für die peroxisomale Membran ist bis jetzt unbekannt. In der Literatur sind für solche Membranen keine gebundenen Enzyme beschrieben außer einer geringen Aktivität einer Antimycin A - insensitiven NADH - Cytochrom c - Reduktase ²²⁾. Dies ist in dieser Arbeit auch für die peroxisomale Membran aus Linsen (vgl. S. 42) bestätigt, doch zeigt schon die Tatsache, daß das endoplasmatische Retikulum eine um Größenordnungen höhere spezifische Aktivität als die Peroxisomenmembran, aber kein SP-63 besitzt (Abb. 10), daß das SP-63 nicht mit dieser Enzymaktivität identisch sein kann. Außerdem wird für Glyoxysomen aus Rizinus ⁹⁾ dieses Enzym als größtenteils KCl - extrahierbar beschrieben.

Als enzymatische Aktivität, die aufgrund des Molekulargewichts zu diskutieren wäre, kommt die Malatsynthase als Enzym mit einem Untereinheiten - Molekulargewicht von 62 000 ⁷⁵⁾ in Betracht. Dagegen sprechen allerdings

die Vorstellungen zum Auftreten der Malatsynthase nur in Glyoxysomen, die teilweise leichte Ablösung von der Membran und die Tatsache, daß in der Peroxisomenmembran-Suspension keinerlei Malatsynthase - Aktivität feststellbar ist.

Der hohe Anteil des SP-63 am Membranprotein der Peroxisomen weist diesem Protein eine entscheidende Bedeutung zu; über eine Funktion in der "Überwindung der Permeabilitätsbarriere der Membran für niedermolekulare Stoffe, die die Peroxisomen in der Reaktionssequenz des Glykolatzyklus aufnehmen und abgeben, können allerdings nur Spekulationen geäußert werden.

2. Intrazelluläre Lokalisierung des SP-63

Zwei "Überlegungen führen zur Untersuchung der intrazellulären Verteilung des SP-63 :

- Es ist zu klären, ob das in der SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese erhaltene Proteilmuster tatsächlich auf peroxisomale Membranproteine zurückzuführen ist oder ob "Überlagerungen mit anderen Zellorganellen und Membranen im Saccharosegradienten am Punkt höchster Katalase - Aktivität dieses Bild verfälschen.
- Sind weitere Zellorganellen oder Membranen nachweisbar, die das gleiche Protein besitzen, so würden diese in ihrer Funktion als mögliche Vorläufer für die Peroxisomenmembran zu diskutieren sein.

Untersuchungen von Thylakoid - Membranproteinen verschiedener Herkunft in SDS - Gelelektrophoresen haben wiederholt ^{78,79,80)} Untereinheiten auch im Molekulargewichtsbereich zwischen 60 000 und 70 000 nachgewiesen, die zum Teil jedoch unter reduzierenden Bedingungen ⁷⁸⁾ in kleinere Polypeptide zerfielen. Wie Abb. 8a zeigt, enthalten die Thylakoid - Membranen aus Linsen - Laubblättern keine Proteinuntereinheit vom Molekulargewicht 63 000, so daß eine Kontamination mit Thylakoid - Protein für diese Bande eindeutig auszuschließen ist; trotz Flotation der Thylakoide im Gradienten können Peroxisomenfraktionen allerdings nie völlig frei von Chlorophyll isoliert werden.

Mitochondrien stellen sich im Gradienten bei einer Dichte von etwa 1.195 g/cm^3 ein und liegen somit in Nachbarschaft zu den Peroxisomen. Abb. 8a und b zeigen jedoch, daß es gelingt, peroxisomale Membranen zu erhalten, deren elektrophoretisches Muster völlig frei von Komponenten ist, die dem Fumarasemaximum zuzuordnen sind (z.B. Abb. 7); das Verhältnis der beiden Leitenzyme Fumarase und Katalase ist streng korreliert mit der Relation der beiden Banden vom Molekulargewicht 55 000 und 63 000. Bei Dichten über ca. 50 % Saccharose (oder nach einem zweiten Gradientenlauf) liegen dem elektrophoretischen Bild zufolge (Abb. 8b) sehr reine Peroxisomen bzw. Membranen vor; allerdings nehmen Katalasegehalt und Gesamtprotein im ersten Gradienten dann parallel stark ab.

Ebenso ist für das endoplasmatische Retikulum, charakterisiert durch Sedimentationsverhalten, Gleichgewichtsdichte und Leitenzym, gezeigt, daß es kein Protein ent-

hält, das in Molekulargewicht und Solubilisierungseigenschaften dem peroxisomalen SP-63 entspricht (Abb. 9).

Das ER wird ohne Mg^{++} in Anwesenheit von EDTA über einen Saccharosegradienten gereinigt (man geht entweder aus von dem $100\ 000 \times g$ - Differentialzentrifugationsniederschlag oder von Material nach einer Geschwindigkeitszentrifugation des $15\ 000 \times g$ - "Überstandes"); das Maximum der Antimycin A - insensitiven NADH - Cytochrom c - Reduktase ²²⁾ liegt bei 27 - 29 % Saccharose entsprechend $1.117\ g/cm^3$.

Die ER - Membranen sind aus bisher ungeklärter Ursache nur schwer einer SDS - Elektrophorese zugänglich (vgl. S. 44). Trotzdem läßt sich zeigen, daß im Molekulargewichtsbereich zwischen 50 000 und 70 000 Banden der Proteinuntereinheiten auftreten, die jedoch in ihrer Mobilität nicht mit dem SP-63 identisch sind.

Für pflanzliche Mikrokörper ist dem ER seit langem eine Bedeutung als Vorläufer in der Biogenese der Mikrokörper - Membran zugeschrieben worden. Vor kurzem wurde für Rizinus - Glyoxysomen auf SDS - Gelen ein Vergleich der Polypeptid - Muster zwischen puffergewaschenen Membranen von Glyoxysomen und dem ER angestellt ³⁷⁾ , der nicht nur Ähnlichkeiten in den Proteinmustern, sondern sogar ihre Identität, auch nach Detergenz - Behandlung, beweisen soll. Diese Vorstellung würde beinhalten, daß Glyoxysomen die gesamte Synthesekapazität des ER mitübernommen und zunächst intakt vorliegen hätten, andererseits stellt sich aber die Frage, warum bestimmte membrangebundene Enzyme (Glyoxylat - Zyklus - Enzyme, β -

Oxidation) der Glyoxysomen in der elektrophoretischen Auftrennung bei den Glyoxysomen keine zusätzlichen Banden hervorrufen.

Die hier untersuchte Peroxisomenmembran der Linsen - Laubblätter zeigt keine "Ähnlichkeit mit dem Muster des ER, da ihre Hauptbande (SP-63) nicht als Komponente des ER vorhanden ist. Dies kann kein generelles Argument gegen eine Herkunft der Mikrokörper - Membran aus dem Membransystem des ER sein, für die auch weitere Kriterien sprechen, so z.B. der ähnliche Phospholipid - Gehalt ²²⁾ ; zumindest in diesem Entwicklungsstadium ist keine "Übereinstimmung in den Membranproteinen mehr feststellbar. Gleiches gilt auch für die spezifische Aktivität der NADH - Cytochrom c - Reduktase in der Peroxisomenmembran, die um 2 Größenordnungen niedriger liegt (vgl. S. 42) als in der ER - Membran.

3. Relevanz

Neben der eigentlichen Aussage der Ergebnisse über die Proteinzusammensetzung der Peroxisomenmembran und Eigenschaften ihres Hauptproteins in Laubblättern von *Lens culinaris* können sie als Vorarbeiten zur Erfassung eines weiteren charakteristischen Parameters der Peroxisomen angesehen werden, mit dessen Hilfe Aussagen sowohl über die Biogenese der Peroxisomen als auch über den "Übergang von glyoxysomalen zu peroxisomalen Aktivitäten möglich sein sollten.

Während dieser 2. Parameter "Membran" bisher nur über das Membranlipid erfaßt wurde ³³⁾, was aufgrund des spontanen Austauschs des Lipids zwischen verschiedenen Membranen, wie in vitro ⁸¹⁾ demonstriert, problematisch erscheinen muß, bietet dieses Membranprotein den Vorteil des ausschließlichen Vorkommens in den Peroxisomen und der festen Bindung an ihre Membran.

V. Literaturverzeichnis

- 1 Frederick, S. E., Gruber, P. J. und Newcomb, E. H.
(1975) Protoplasma 84, 1
- 2 Vigil, E. L. (1973) Sub-Cell. Biochem. 2, 237
- 3 Avers, C. J. (1971) Sub-Cell. Biochem. 1, 25
- 4 DeDuve, C. (1965) J. Cell Biol. 27, 25
- 5 Breidenbach, R. W. und Beevers, H. (1967)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 27, 462
- 6 Trelease, R. N., Becker, W. M., Gruber, P. J. und
Newcomb, E. H. (1971) Plant Physiol. 48, 461
- 7 Cooper, T. G. und Beevers, H. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 3514
- 8 Kindl, H. und Majunke, G. (1973) Hoppe Seyler's Z.
Physiol. Chem. 354, 987
- 9 Biegelmayr, C., Nahler, G. und Ruis, H. (1974)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 1121
- 10 Breidenbach, R. W., Kahn, A. und Beevers, H. (1968)
Plant Physiol. 43, 705
- 11 Hock, B. und Beevers, H. (1966)
Z. Pflanzenphysiol. 55, 405
- 12 Tolbert, N. E., Oeser, A., Kisaki, T., Hageman, R. H.
und Yamazaki, R. K. (1968), J. Biol. Chem. 243, 5179
- 13 Andrews, T. J., Lorimer, G. H. und Tolbert, N. E. (1973)
Biochem. 12, 11
- 14 Kisaki, T. und Tolbert, N. E. (1969) Plant
Physiol. 44, 242
- 15 Lorimer, G. H. und Andrews, T. J. (1973)
Nature 243, 359
- 16 Rehfeld, D. W., Randall, D. D. und Tolbert, N. E.
(1970) Can. J. Bot. 48, 1219
- 17 Burke, J. J. und Trelease, R. N. (1975) Plant
Physiol. 56, 710
- 18 Moore, T. S. und Beevers, H. (1974) Plant
Physiol. 53, 261

- 19 Feierabend, J. und Beevers, H. (1972) Plant Physiol. 49, 28
- 20 Kindl, H. und Majunke, G. (1973) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 999
- 21 Gruber, P. J., Becker, W. M. und Newcomb, E. H. (1973) J. Cell Biol. 56, 500
- 22 Donaldson, R. P., Tolbert, N. E. und Schnarrenberger, C. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 152, 199
- 23 Feierabend, J. und Beevers, H. (1972) Plant Physiol. 49, 33
- 24 Ludwig, B. und Kindl, H. (1976) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 177 und 393
- 25 Kagawa, T. und Beevers, H. (1970) Plant Physiol. 46, 38
- 26 Kagawa, T., McGregor, D. I. und Beevers, H. (1973), Plant Physiol. 51, 66
- 27 Kagawa, T. und Beevers, H. (1975) Plant Physiol. 55, 258
- 28 Schnarrenberger, C., Oeser, A. und Tolbert, N. E. (1971) Plant Physiol. 48, 566
- 29 Geißler, W. G. und Kindl, H. (1975) FEBS-L. 58, 322
- 30 Theimer, R. R. (1976) FEBS-L. 62, 297
- 31 Theimer, R. R., Auding, G. und Schmid-Neuhaus, B. (1975) FEBS-L. 57, 89
- 32 Moore, T. S., Lord, J. M., Kagawa, T. und Beevers, H. (1973) Plant Physiol. 52, 50
- 33 Kagawa, T., Lord, J. M. und Beevers, H. (1973) Plant Physiol. 51, 61
- 34 Kagawa, T., Lord, J. M. und Beevers, H. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 167, 45
- 35 Brown, R. H., Lord, J. M. und Merrett, M. J. (1974) Biochem. J. 144, 559
- 36 Biegelmayer, C. und Ruis, H. (1974) FEBS-L. 47, 53
- 37 Bowden, L. und Lord, J. M. (1976) Biochem. J. 154, 491

- 38 Shapiro, A. L. und Maizel, J. V. (1969)
Anal. Biochem. 29, 505
- 39 Weber, K., Pringle, J. R. und Osborn, M. (1972)
Methods Enzymol. 26, 3
- 40 Henning, U. und Haller, I. (1975) FEBS-L. 55, 161
- 41 Kirpatrick, F. H., Gordesky, S. E. und Marinetti,
G. V. (1974) Biochim. Biophys. Acta 345, 154
- 42 Stegemann, H. (1970) Z. Anal. Chem. 252, 165
- 43 Arbeitsvorschrift zur Stegemann-Apparatur, Juni 1974
- 44 Stephens, R. E. (1975) Anal. Biochem. 65, 369
- 45 Bragg, P. D. und Hou, C. (1972) Biochim. Biophys.
Acta 274, 478
- 46 Dunker, A. K., und Rueckert, R. R. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 5074
- 47 Stegemann, H., Franckson, H. und Macko, V. (1973)
Z. Naturforsch. 28c, 722
- 48 Garewal, H. S., Singh, J. und Wasserman, A. R.
(1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 1300
- 49 Weber, K. und Kuter, D. J. (1971) J. Biol. Chem.
246, 4504
- 50 Miller, D. W. und Elgin, S. C. R. (1974)
Anal. Biochem. 60, 142
- 51 Wrigley, C. W. (1971) Methods Enzymol. 22, 559
- 52 Udenfried, S., Stein, S., Böhlen, P., Dairman, W.,
Leimgruber, W. und Weigle, M. (1972) Science
178, 871
- 53 Arbeitsvorschrift Hoffmann-La Roche, Juni 1973
- 54 Shelton, K. R. (1971) Biochem. Biophys. Res.
Commun. 43, 367
- 55 Berg, H. C. und Hirsh, D. (1975) Anal. Biochem.
66, 629
- 56 Carraway, K. L. (1975) Biochim. Biophys. Acta
415, 379
- 57 Spackman, D. H., Stein, W. H. und Moore, S. (1958)
Anal. Chem. 30, 1190

- 58 Glossmann, H. und Neville, D. N. (1971)
J. Biol. Chem. 246, 6339
- 59 Bergmeyer, H. U., Gawehn, K. und Graßl, M. (1970)
in Methoden der enzymat. Analyse (Bergmeyer, H. U.,
Hrsg.) Band 1, S. 388, Verlag Chemie, Weinheim
- 60 Cooper, T. G. und Beevers, H. (1969) J. Biol.
Chem. 244, 3507
- 61 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und
Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265
- 62 Handbook of Chemistry and Physics (West, R. C.,
Hrsg) 53. Ausg. 1972/73 Chem. Rubber Co,
Cleveland, Ohio
- 63 Isolab-Produktinformation (Acron, Ohio), 1974
- 64 Mahin, D. T. und Lofberg, R. T. (1966)
Anal. Biochem. 16, 500
- 65 Machold, O. (1975) Biochim. Biophys. Acta 382, 494
- 66 Novac-Hofer, I. und Siegenthaler, P. A. (1975)
FEBS-L. 60, 47
- 67 Capaldi, R. A. und Vanderkooi, G. (1972) Proc.
Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 930
- 68 Schiefer, S., Teifel, W. und Kindl, H. (1976)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 163
- 69 Bieglmayer, C., Graf, J. und Ruis, H. (1973)
Eur. J. Biochem. 37, 553
- 70 Diplomarbeit E. Hannappel, Marburg 1974
- 71 Coleman, R. (1973) Biochim. Biophys. Acta 300, 1
- 72 Tzagoloff, A. und Penefsky, H. S. (1971) 22, 219
- 73 Helenius, A. und Simons, K. (1975) Biochim.
Biophys. Acta 415, 29
- 74 MacLennan, D. H. (1975) Can. J. Biochem. 53, 251
- 75 Diplomarbeit W. Köller, Marburg 1976
- 76 Umbreit, J. N. und Strominger, J. L. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 6759
- 77 Lagoutte, B. und Duranton, J. (1976) Biochim.
Biophys. Acta 427, 141
- 78 Machold, O. (1974) Biochem. Physiol. Pflanzen 166, 149

Für die Durchführung der Aminosäuren - Analyse
danke ich Dr. H. G. Löffler, Physiol. Chemie,
Fachbereich Medizin .

- 79 Eaglesham, A. R. J. und Ellis, R. J. (1974) Biochim. Biophys. Acta 335, 396
- 80 Menke, W., Koenig, F., Radunz, A. und Schmid, G. H. (1975) FEBS-L. 49, 372
- 81 Abdelkader, A. und Mazliak, P. (1970) Eur. J. Biochem. 15, 250

Lebenslauf

Am 14.12.1947 wurde ich in Alsfeld / Hessen geboren.
Nach Besuch der Volksschule in Behra von 1954 - 58
und des Gymnasiums in Rotenburg / F. von 1958 - 66
und nach Ableistung des Wehrdienstes begann ich im
Sommersemester 1968 das Chemiestudium in Marburg.

Meine Diplomarbeit im Fachgebiet Biochemie befaßte
sich mit dem Stoffwechsel von L - Phenylalanin in
Thylakoiden höherer Pflanzen.

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von
Prof. Dr. H. Kindl in der Zeit von Sept. 73 bis
April 76 im Fachgebiet Biochemie am Fachbereich
Chemie durchgeführt.

